جامعة دمشق – كلية العلوم

قسم علم الحياة النباتية

هيئة الطاقة الذرية السورية

قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية

تحديد هوية مورثة زنك بروتياز عند البروسيلا الضأنية والتعبير عنها

دراسة أعدت لنيل درجة الماجستير في الأحياء الدقيقة

إعداد

دانا تيسير زعيتر

بإشراف

المشرف الرئيسي

أ.د. ابتسام حمد

المشرف المشارك

د. أيمن المريري

التعاون العلمي

د. بسام البلعة

لجنة الحكم:

الدكتورة ابتسام حمد	أستاذة في كلية العلوم بجامعة دمشق عضواً مشرفاً
الدكتور عصام قاسم	أستاذ في كلية العلوم بجامعة دمشق عضواً
الدكتور بسام البلعة	باحث في هيئة الطاقة الذرية السورية عضواً

18.10.2010

إهداء

أمي الحبيبة، أبي الغالي...

أيُّ الكلمات من الممكن أن تصفكما...

أعترف بأن كلماتي عاجزةٌ وضعيفةٌ أمام عظمتكما...

أمام حنانكما... أمام قلبكما... أمام عقلكما...وفكركما...

إلا أن مكانتكما عندي أبلغُ من أي كلمة من الممكن أن يخطها قلمي...

أرجو من الله أن يمد في عمركما لترنا ثماراً حان قطافها بعد طول انتظار...

شكراً لكما،لمنحني الأمل والثقة والحب التي لولاها ما كان لهذا العمل أن يرى النور إطلاقاً...

شكراً لكما، فلولا حبكما ودعمكما ودعائكما لكان من الصعب عليَّ تحقيق أهدافي...

وإذا كانت هذه الأطروحة تستحق الوقت الذي أمضيته بعيدةً عنكما..

فسيكون كل حرفٍ في كل صفحةٍ منها لا يقدر بثمن...

إخوتي الأعزاء...

محمد أنس وبراء وعبيد الله ومعاذ وعبد الله

شكراً لكم، لصبركم وتشجيعكم، لتفهمكم وحبكم

شكراً لكم، لمنحي الإبتسامة وإجباري على الضحك رغم كل الضغوطات

المخلصة لكم دوماً

دانا زعيتر

01.08.2010

شكر وتقدير

بسم الله الرحمن الرحيم

اللهم منك... وإليك

وأنا أضع اللمسات الأخيرة على رسالتي، لحظاتٌ قد لايجدُ الإنسانُ كلماتٍ تعبِّر عمايجول في خلجاتِ نفسه من مشاعر تُجاه أولئك اللذين قدموا له العون والدعم...ولكني تذكرت قول رسولنا الكريم ﷺ: **(من صُنع إليه معروف فقال لفاعله جزاك الله خيراً فقد أبلغ في الثناء)**، لذا فإن أبلغ ما يمكن أن يقوله الإنسان في مثل هذه المواقف: "**جزاكم الله خيراً**".

بدايةً أتقدم بالشكر الجزيل لأعضاء لجنة الحكم الأستاذة الدكتورة ابتسام حمد والأستاذ الدكتور عصام قاسم والدكتور بسام البلعة لقبولهم تحكيم ومناقشة هذه الأطروحة، وأقدر بعمق توجيههم وخبرتهم وأشكرهم على ملاحظاتهم القيمة. كما أتقدم بجزيل الشكر إلى أساتذتي المشرفين، الأستاذة الدكتورة ابتسام حمد التي تكرمت بالإشراف على رسالتي، مزيلةً كافة العقبات عن طريقي، مزودةً إياي بتوجيهاتها ودعمها الدائمين، والتي كان لها كبير الفضل في جميع مراحل البحث وخطواته. كما أُبدي شكري وامتناني للدكتور أيمن المريري، الذي كان أستاذاً حازماً حين يلمس التقاعس مني، وأخاً عطوفاً وإنساناً حين يلمس السأم والملل، ومشجعاً حين يلحظ الجد والاجتهاد، شكراً على صبرك وجَلدك، شكراً على إعانتك وصداقتك، التي امتدت لنا رغم مشاغلك الكثيرة، لذا أخشى أن تعجز الكلمات عن الاعتراف بالجميل فلك مني خالص الاحترام والتقدير. كما أدين بشكري بصدقٍ للدكتور بسام البلعة الذي أغنى بعلمه الغزير وخبراته الواسعة فصول هذه الرسالة والذي كان لنا خير موجهٍ ومرشد، فمساهمته الضخمة تتجلى في كل صفحةٍ من فصول هذه الأطروحة، شكراً لك فلولا دعمك ومساندتك وثقتك ما كان لهذا العمل أن يكتمل إطلاقاً، شكراً لتفهمك الشديد لنا وصبرك علينا ونقدك البنَّاء لنا، أعلم أن كلمة شكراً من المستحيل أن توفيك جزءًا من حقك فعلاً...فجزاك الله عنا خيراً. بصراحة، إن شكري وامتناني لكم لا يمكن أن تعبر عنه الكلمات، فقد كانت متعةً حقيقيةً بالنسبة لي أن أعملَ مع أشخاص مثلكم، رائعين بكل ما تعنيه الكلمة...شكراً لكم لجو المرح الذي تثيرونه في المخبر، كي يكون العمل أكثر إمتاعاً وروعةً...لذلك لايسعني إلا أن أقول بصدق: إذا وصلت إلى ما وصلت إليه اليوم "**فبفضل وقوفي على أكتاف عمالقة**" بعد فضل الله ﷻ.

شكر وتقدير

صديقاتي العزيزات، باسمة عرابي ودعاء الطيلوني ودانيا قباني وقمر بيضة ومريم كف الغزال وعلياء النعوفي وجنى المير أسعد وعبير الخضراوي ودينا علي، بصراحة لا أعرف أين أضعكم؟ مع أخواتي أم أساتذتي أم صديقاتي، فأنتم كلهم...شكراً لحبكم، لدعمكم، لتفهمكم ولدعابتكم.

أود أيضاً أن أشكر كل شخصٍ ساعدني خلال هذه المدة، فشكراً لجميع دكاترة وعناصر دائرة الميكروبيولوجيا والمناعيات من فنيين ومخبريين لمساعدتهم وإيجابيتهم مما جعل المخبر مكاناً ينضح بالسعادة والمرح والحيوية، أخص منهم د. عبد القادر عبادي ود. مازن صافي ود. حسام حاج علي، رند عكل وليلي الحلاب ونيرمين حاج محمود ورزان حمود وليلى رمضان وربا عودة وغالية الحبّال ومنال حويجة وسماح قاسم وآلاء سعيّد، باسل العبيد وأنس اللحام ومحمد سعيد ومحمد صبرة وفواز الشولي ووليد ملوك وبشار رشود وربيع زهيرة. كما يُسعدني أن أُبدي شكري وعرفاني أيضاً للدكتور نزار مير علي رئيس قسم التقانة الحيوية والبيولوجيا الجزيئية والدكتور وليد الأشقر مدير دائرة الوراثة البشرية والصبغيات وجميع العاملين في هذه الدائرة، وأخص منهم: محمد صياح نويدر وهاني سعيد وبثينة علي، لتعاونهم ومساعدتهم.

كما أتقدم بالشكر الجزيل إلى رئاسة قسم علم الحياة النباتية وجميع الأساتذة والعاملين وطلاب الدراسات والمعيدين فيها. ولا يفوتني أن أشكر المعيد الموفد سارية الأوتاني لمساعدته الكبيرة لي في الحصول على العديد من المقالات المنشورة في المواقع العلمية الشهيرة. وكل الشكر والتقدير للأستاذ الدكتور عصام قاسم عميد كلية العلوم لتعاونه الشديد معنا وتقديمه كافة التسهيلات الممكنة.

أخيراً، أعرب عن شكري وامتناني إلى الدكتور إبراهيم عثمان، مدير هيئة الطاقة الذرية السورية، لجهوده الحثيثة في دعم العلم والمعرفة، ولتفضله بالموافقة على استضافتي لانجاز رسالتي في مخابر الهيئة. كما أود أن أشكر كل شخصٍ ساعدني خلال هذه المدة ولم يتسنَّ لي أن أذكره هنا، إلا أنَّ ذكراه باقيةٌ بكل تأكيدٍ في حنايا الذاكرة، جزاكم الله عني كل خير، أتمنى لكم التوفيق.

دانا زعيتر

10.08.2010

الملخص

ABSTRACT

تمَّ عزل وتضخيم المورثة المرمزة لبروتين الزنك بروتياز بواسطة تقانة الـ PCR باستخدام الدنا المُستخلص من جينوم البروسيلا الضأنية. صُمم زوج من المرئسات Primers لهذه المورثة يحويان على مواقع التقييد لأنزيمي NdeI و BamHI في النهايتين 5’ و3’ على التوالي. حيث استخدمت تلك المرئسات في تضخيم شدفة بطول 927 شفع آزوتي (bp). هُضِمت الشدفة وأُدخلت ضمن بلاسميد التعبير pET-15(b) المقطوع بنفس الأنزيمات، بيّنت السَلسلة أن المورثة التي تم تنسيلها خالية من أي طفرة من الممكن أن تحدث أثناء عملية التنسيل إضافةً إلى اندراجها في مكانها الصحيح ضمن البلاسميد والذي يسمح بالتعبير عنها والحصول على البروتين المرمزة له لاحقاً. أُدخل البلاسميد المؤشب فيما بعد ضمن بكتريا الـ *Escherichia coli* BL21 (DE3) من أجل التعبير البروتيني، حيث تم التعبير عن مورثة الزنك بروتياز باستخدام الـ Isopropyl β-*D*-1-thiogalactopyranoside (IPTG). تمت أمثلة التعبير عن هذا البروتين باستخدام تراكيز مختلفة من الـ IPTG ودرجات الحرارة، ولكن في جميع هذه الشروط تبين أن التعبير عن بروتين الزنك بروتياز في بكتريا الـ *E. coli* كان ساماً حيث نتج عنه تثبيط نمو الخلايا واستطالتها. فقد لوحظ بعد ساعتين من التحريض أن التعبير عن هذا البروتياز حرّض الموت الخلوي البكتيري. تم الكشف عن فاعلية أنزيم الزنك بروتياز في حلِّ البروتينات بتشكيل هالةٍ شفافةٍ حول المستعمرات المستنبتة على وسط الـ Luria-Bertani (LB) الحاوي على حليب منزوع الدسم.

فهرس الجداول
LIST OF TABLES

فهرس الأشكال
LIST OF FIGURES

α	Alfa
β	Beta
16M	*B. melitensis* strain 16M
45/20	*B. abortus* strain 45/20
2308	*B. abortus* strain 2308
AECS	Atomic Energy Commission of Syria
Amp	Ampicillin
APC	Antigen presenting cell
APS	Ammonium Persulfate
ATP	Adenosine triphosphate
BME	β-Mercaptoethanol
BLAST	Basic local alignment search tool
bp	Base pair
°C	Celsius
Cm	Chloramphenicol
conc.	Concentration
d10	d electron count 10
d.d H_2O	Double distilled water
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dNTP	Deoxynucleotide triphosphate
DTT	Dithiothreitol
E. coli	*Escherichia coli*
EC. NO	Enzyme Commission number
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EtBr	Ethidium Bromide
EtOH	Ethanol
E	Glutamic acid
H38	*B. melitensis* strain H38
HRP	Horseradish peroxidase
H	Histidine
IPTG	Isopropyl β-*D*-1-thiogalactopyranoside
kDa	Kilodalton
kb	Kilo base
L	Liter
LB	Luria-Bertani broth
LPS	Lipopolysaccharide
µg	Microgram
µl	Microliter (10^{-6})
MCS	Multiple cloning site
mg	Milligram
ml	Milliliter
mins	Minutes
mM	Millimolar

mRNA	Messenger RNA
NCBI	National Center for Biotechnology
ng	Nanogram (10^{-9})
OD	Optical density
omps	Outer membrane proteins
ORF	Open reading frame
Ori	Origin of replication
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCD	Programmed cell death
PCR	polymerase chain reaction
pH	Power of hydrogen
PMN	Polymorphonuclear
pmol	Picomole
RB51	*B. abortus* strain RB51
RBS	Ribosomal binding site
RevI	*B. melitensis* strain Rev. 1
RNA	Ribonucleic acid
Rnase	Ribonuclease
rRNA	Ribosomal RNA
rpm	Rounds per minute
S19	*B. abortus* strain 19
SARS	Severe Acute Respiratory Syndrome
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SOD	Superoxide dismutase
TAE	Tris base, acetic acid and EDTA
Taq	Thermus aquaticus
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TCA	Trichloroacetic acid
Tris	2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol
UV	Ultraviolet
V	Volt
WHO	World Health Organization
x	Amino acid
xyl	Xylanase
zn	Zinc
zp	Zinc protease

الفصل الأول

المقدمة والدراسات المرجعية

المقدمة

1.1. المقدمة: Introduction

تواجه الإنسانية الكثير من التحديات التي تتطلب حلولاً عمليةً وعالمية، يتمثل أحد هذه التحديات في انتشار الأمراض المشتركة Zoonotic disease من خلال الاتصال بين الحيوانات والبشر والنظم البيئية التي يعيشون فيها، فالعلاقة بين الإنسان والحيوان أزلية تتمحور حول المنفعة المتبادلة بينهما، إلا أن الشيء المشترك السلبي بين الطرفين هو الأمراض المشتركة، حيث تُعد الحيوانات مستودعاً للعدوى ووسيلةً لانتقال العديد من هذه الأمراض، والتي عرّفتها منظمة الصحة العالمية WHO (World Health Organization) عام 1959 بأنها "الأمراض والإصابات المرضية التي تنتقل بصورة طبيعية بين الإنسان والحيوانات الفقارية الأخرى". تكمن خطورة هذه الأمراض في أنها تؤثر على الثروة الحيوانية التي تُشكل أحد أهم المصادر الأساسية للغذاء البشري وبالتالي الحالة الصحية للأفراد، كما أنها تسبب خسائر اقتصادية فادحة خصوصاً في البلدان التي تعتمد على الحيوانات كمصادر أساسيةٍ للغذاء. حيث أظهرت العديد من الأبحاث خطورةَ الأمراض التي تصيب الحيوانات والتي يُمكن أن تنتقل من خلالها إلى الإنسان، يمكن لهذه الأمراض أن تُصنف اعتماداً على مسبب المرض إلى: أمراض بكتيرية، مثل: داء السالمونيلات Salmonellosis وداء البروسيلات Brucellosis والجمرة الخبيثة Anthrax. وأمراض فيروسية، مثل: الأنفلونزا Influenza وداء الكلب Rabies وحمى الوادي المتصدع Rift Valley Fever. وأمراض طفيلية مثل: داء الشريطيات Taeniasis وداء المقوسات Toxoplasmosis وداء الليشمانيات Leishmaniasis. وأمراض فطرية، مثل: القراع أو سعفة الرأس Tinea Capitis. كما يتوقع الخبراء أن تزيد حدة هذه المشكلة خلال العقود القادمة نظراً لظهور مسبباتٍ جديدةٍ للأمراض لم يكن معروفاً أنها تتحور لتنتقل من الإنسان إلى الحيوان، ومن أمثلة هذه الأمراض جنون البقر Mad-cow disease وسارس SARS وأنفلونزا الطيور Avian influenza وأنفلونزا الخنازير Swine influenza.

إن دراسة الأمراض المشتركة يعتمد على توضيح العامل المسبب مع التشديد على العوامل المختلفة المسؤولة عن انتقال العدوى من الحيوان للإنسان والعكس، كما أن فهم هذه الأمراض يقترن باعتبار موضوع الطب البيطري والبشري بمجموعهما وحدةٍ متكاملة حيث قال بافلوف في هذا الصدد: "**إذا كان الطبيب البشري يعالج الإنسانية فإن الطبيب البيطري يحافظ على الإنسانية**".

⊙ أهداف البحث:

إن الهدف من هذه الدراسة هو عزل وتنسيل وتحديد هوية مورثة الزنك بروتياز المعزولة من جينوم البروسيلا الضأنية *Brucella melitensis* والتعبير عنها، حيث أظهرت العديد من الدراسات امتلاك أنزيم الزنك بروتياز المعزول من الكائنات الممرضة دوراً هاماً في الإمراضية. لذلك فالمساهمة المتوقعة لهذا البروتين في الإمراضية، هو الذي جعل الاختيار يقع على هذه المورثة ليتم تنسيلها والتعبير عنها.

2.1. داء البروسيلات: Brucellosis

1.2.1. لمحة تاريخية: Brief History

المرض ذو تاريخ قديم، إذ إنه عُرف منذ القرن الخامس قبل الميلاد، حيث أشار إليه أبو قراط Hippocrates وخلط بين الحمى المتقطعة وبين الحُميَّات الأخرى التي تظهر في منطقة حوض البحر الأبيض المتوسط (Evans, 1950). كما تم الكشف عن كائنات عصوية كروية تشبه أنواع البروسيلا في الجبن المكربن Carbonized cheese في العهد الروماني (Capasso, 2002). وإن كان ذلك صحيحاً فإن هذا المرض الذي يُعرف حالياً بداء البروسيلات كان معروفاً منذ مدة طويلة.

في التاريخ الحديث بدأ الاهتمام بهذا الداء عند انتشاره خلال حرب القرم Crimean War (هي حرب قامت بين روسيا والدولة العثمانية في عام 1853 م، واستمرت حتى عام 1856 م)، حيثُ أصيب به الجنود وهم على متن الباخرة (Bruce, 1887)، ثمَّ تم تصنيفه كمرضٍ مستقلٍ بذاته، وذي أعراض محددةٍ تميزه عن غيره من أمراض حوض البحر الأبيض المتوسط، وذلك من خلال الوصف الذي قدمه الجراح البريطاني Marston عام 1859 نتيجة إصابته بهذا المرض (Vassalo, 1992). وفي نهاية القرن الثامن عشر انتشر المرض بصورة وبائية بين جنود الجيش الإنجليزي في جزيرة مالطا، وعكف الطبيب David Bruce على دراسة المرض، حتى تمكن من عزل العامل المسبب للمرض من طحال بعض الجنود البريطانيين الذين توفوا بعد إصابتهم بالحمى نتيجةً لتناولهم حليباً ملوثاً. وأطلق عليه اسم *Micrococcus melitensis*، نسبةً إلى أول مكان اكتشفت فيه وهي الجزيرة التي كان الرومان يطلقون عليها اسم Melita (Godfroid *et al.*, 2005) وكان ذلك أول اكتشاف للبروسيلا بالبشر قبل أن تُصنف كعامل مسبب للمرض عام 1905.

اكتشف الطبيب البيطري Benhard Bang عام 1897عصيات بانج Bang's bacillus أو العصيات المسببة للإجهاض ولم يتم التعرف على علاقة عصيات بانج مع *Micrococcus melitensis* حتى وضَّح Alice Evans الذي يعمل في مخابر الصحة العامة في الولايات المتحدة عام 1918 طبيعة العلاقة الوثيقة التي تربط بين هاتين المتعضيتين وحينها أعاد تسمية كليهما باسم البروسيلا *Brucella* تيمناً بالعالم Bruce (Nicoletti, 2002; Meyer and Show, 1920).

وفي عام 1905 تم تصنيف هذا المرض من ضمن الأمراض المشتركة صدفةً عن طريق عزل البروسيلا الضأنية *B. melitensis* من حليب الأغنام المستخدم في إنتاج الجبنة الرخوة Soft cheese في جزيرة مالطا (Godfroid *et al.*, 2005; Nicoletti, 2002)، حيث كان يُعتقد أن الأغنام ليست مصدراً

للعدوى وذلك نتيجةً لعدم إصابتها بالمرض عند حقنها بمزارع البروسيلا، وبالرغم من أن حليب الأغنام الطازج كان يُعد وجبةً غنيةً بالمغذيات للمرضى الذين يعانون من داء البروسيلات، إلا أنه تم حظر تداوله في المستشفيات بعد هذا الاكتشاف، لكن العامة لم يُدركوا أهمية هذا الحظر وقاموا باستهلاك منتجات الحليب الملوثة وبذلك بقوا معرضين لخطر المرض (Nicoletti, 2002).

2.2.1. التعريف بالمرض: The disease

تسبب العدوى بالبروسيلا مرضاً جهازياً مترافقاً مع الحمى يدعى بداء البروسيلات، يُعرف هذا الداء في الحيوانات باسم الإجهاض المُعدي Contagious Abortion أو مرض بانج Bang's disease، وفي الإنسان بالحمى المالطية Malta fever أو الحمى المتموجة Undulant fever (Spink, 1956). يؤثر هذا الداء على الثروة الحيوانية، التي تُعد من مصادر الدخل الرئيسية لمعظم الدول، يظهر هذا التأثير على الحيوان المُصاب بانخفاض إنتاجه للحليب والعقم والإجهاض إضافةً إلى تكلفة العلاج لحالات احتباس المشيمة والتهاب الضرع. وتتعاظم خطورته لسهولة انتقاله للإنسان وتأثيره على صحته وسلامته خصوصاً في البلدان التي تعتمد على المجترات كمصادر أساسيةٍ للغذاء، بالإضافة إلى صعوبة تشخيصه نتيجةً لتداخل أعراضه مع أعراض الكثير من الأمراض التي تصيب الإنسان (Corbel, 1997a).

3.2.1. الانتشارالجغرافي: Geographic distribution

تنتشر إصابات البروسيلا في جميع أنحاء العالم وتسبب خسائر اقتصادية عالية، نتيجة الإجهاض وفقدان الأجنة ونقص إنتاج الحليب، علاوةً على الإصابات البشرية وأثرها في مجال الصحة العامة. تم استئصال المرض والقضاء عليه تماماً في العديد من الدول المتقدمة (Corbel, 1997a)، مثل: الولايات المتحدة الأمريكية والتي وصل إنفاقها على برامج التخلص من البروسيلا الضأنية حوالي 50 مليون دولار، بالإضافة إلى 30 مليون دولار سنوياً لاستمرار البرامج حتى الآن منذ عام 1946، ورغم ذلك مازالت هناك نسبة ضئيلة بحدود 0.1–0.3% في بعض الولايات، إلا أن هنالك العديد من الدول وخصوصاً النامية مازالت تعيش تحت عبء هذا المرض فقد تبين أنه يستوطن في بلدان البحر الأبيض المتوسط وشبه الجزيرة العربية وغرب آسيا وأفريقيا وأمريكا اللاتينية (Refai, 2002)، وقد زاد انتشاره في السنوات الأخيرة نتيجة التربية المكثفة للحيوانات المنتجة للحوم والألبان، إضافةً إلى استيراد الحيوانات من دول ينتشر فيها هذا المرض (الجدول 1). إن النوع الغالب في أمريكا وأوروبا هو البروسيلا المجهضة نتيجة انتشار قطعان الأبقار الحلوب، أما في روسيا والبلقان والبحر الأبيض المتوسط وأفريقيا فتنتشر البروسيلا الضأنية، والتي تشكل خطورةً كبيرةً على الانسان والحيوان لعدم التقدم الواضح في مكافحتها

نتيجة ضآلة الاعتمادات المالية في دول العالم الثالث، وبسبب أسلوب الرعي والتنقل الحر للأغنام والماعز، والخلط بين الأبقار والأغنام في مزارع مشتركة مما يتيح انتشار العدوى، حيث لا تطبق إجراءات الحجر والمكافحة بشكلٍ سليم، لذلك فإن منظمة الصحة العالمية تعتبر هذا المرض، أحد الأمراض المشتركة السبعة المهملة، وهي الأمراض التي يساهم الفقر في بقائها (WHO, 2009).

الجدول (1). حالات الإصابة البشرية بداء البروسيلات سنوياً في مختلف الدول بين عام 1996 و2003. مصدر هذه المعلومات المنظمة العالمية للأوبئة الحيوانية Office International des Epizooties وعدد من وزارات الصحة لمختلف الدول (Pappas, 2005).

Country	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003
Albania	NA	155	376	458	220	NA	NA	NA
Algeria	4357	3,434	2,232	2,223	NA	3,200	NA	2,766
Argentina	NA	676	NA	353	507	NA	296	325
Australia	38	41	45	52	27	NA	40	17
Azerbaijan	NA	624	494	582	654	660	519	407
Colombia	53	42	82	42	NA	27	NA	238
Germany	23	25	18	21	27	25	35	27
Greece	NA	254	435	543	545	405	327	222
Iran	NA	NA	NA	17,168	NA	NA	NA	17,765
Israel	235	151	179	163	131	70	56	56
Italy	1896	1,681	1,461	1,324	1,067	923	813	520
Jordan	957	NA	684	432	288	275	219	159
Lebanon	192	429	136	184	NA	NA	NA	NA
Mexico	3362	3,387	3,550	2,719	2,171	3,013	2,851	3,008
Peru	1691	NA	1,269	NA	1,072	372	991	NA
Portugal	866	1,409	816	683	500	381	206	139
Russia	656	461	NA	352	423	508	595	NA
Saudi Arabia	5997	15,933	5,781	NA	NA	NA	NA	NA
Spain	NA	878	1,520	1,519	1,104	887	886	596
Syria	NA	NA	NA	NA	6,487	4,500	NA	23,297
Tajikistan	257	NA	211	NA	851	752	1,1071	1,471
Tunisia	490	291	206	355	NA	321	250	128
Turkey	9480	11,812	11,427	11,462	10,742	15,510	17,553	14,435
United Kingdom	15	6	7	76	19	26	38	19
United States	112	98	79	82	87	136	125	93

(NA): Not Available تدل على عدم توافر أي معلومات.

- **البروسيلا في سوريا:**

مازال داء البروسيلات من الأمراض المستوطنة في القطر العربي السوري، وقد أعطي الاهتمام منذ مطلع الثمانينات نتيجة لتطور الخدمات الصحية والحاجة لحماية الثروة الحيوانية من الأضرار التي تسببها هذه الأمراض. حيث أعطت وزارة الصحة اهتماماً خاصاً للأمراض المشتركة وخاصة البروسيلا، وأنشأت دائرةً جديدة ضمن مديرية الخدمات الوبائية مهمتها مكافحة الأمراض المشتركة، ومن أهم ما أنجزته هو إقامة المركز الوطني لمكافحة البروسيلا الذي بدأ عمله في مجال المكافحة ومراقبة الوضع الوبائي سواءً في البشر أو في الحيوانات والذي يقوم بكافة عمليات المسح المصلي وإنتاج اللقاحات محلياً.

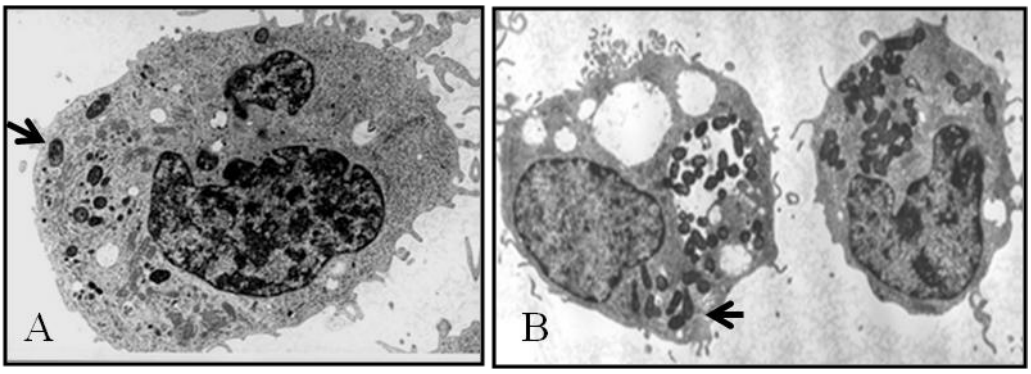
انتشر داء البروسيلات في سوريا بشكل كبير في السنوات الأخيرة. يوضح الجدول (2) تواتر عدد الإصابات بالحمى المالطية في سوريا بين 2000 و 2008؛ حسب Gideon. حيث يُلاحظ تزايد عدد حالات الإصابة من عام 2000 إلى عام 2007 ليصل إلى 40 ألف إصابة تقريباً مسجلة لدى وزارة الصحة ليعود وينخفض هذا الرقم قليلاً إلى 25 ألف إصابة عام 2008. سُجِلت أعلى معدلات لانتشار هذا الداء في محافظة دمشق وحلب ودرعا وذلك وفقاً لقاعدة بيانات الأمراض المعدية المعتمدة عالمياً Global Infectious Diseases Database (www.gideononline.com).

الجدول (2). حالات الإصابة البشرية بداء البروسيلات في سوريا خلال عام 2000–2008.

Years	2000	2001	2003	2004	2007	2008
Infections	6,487	4,500	23,297	29,580	39,838	25,315

4.2.1. العامل المسبب للمرض:Etiology

تُصنف البروسيلا تحت صف البكتيريا الأولية *α-Proteobacteria* والذي يضم خمسةَ أجناس *Rhodobacter*, *Rhizobium*, *Rickettsia*, *Agrobacterium* و *Brucella* (Willliams *et al*., 2007; Gupta, 2005). معظم أنواع هذا الصف تمتلك المقدرة على العيش ضمن خلايا حقيقيات النوى (Sieira *et al*., 2000; Ugalde, 1999). كان يُعتقد أن البروسيلا بالأصل كانت من الممرضات النباتية إلا أنها انتقلت فجأة إلى مضيفها الثديي أثناء التطور (Moreno *et al*., 2002). تنتمي البروسيلا إلى مجموعة البكتريا العصوية الكروية *Coccobacilli*، سالبة الغرام، هوائية اختيارية تستطيع العيش داخل خلايا الجسم وخارجه، عصوية صغيرة الحجم من 0.5–0.7 ميكرومتر (الشكل 1)، غير متحركة، لا تمتلك سياطاً ولا محفظة خارجية، إضافةً إلى أنها غير مشكلة للأبواغ، تنمو بدرجات حرارة من 20–40 °م، ودرجة الحموضة pH المثلى لها هي 6.6–7.4 (Pappas *et al*., 2005)، لا تستخدم السيترات، ولا تُنتج الإيندول Indole، تنتج البروسيلا أنزيم الكاتالاز Catalase وتُرجع النيترات إلى نيتريت. تظهر مستعمرات البروسيلا بعد 2–3 أيام من استنباتها على وسط *Brucella* agar، وتكون المستعمرات صغيرة، دائرة، ملساء، وأحياناً تكون خشنة (Baldwin and Goenka, 2006) وذلك اعتماداً على بنية طبقة متعدد السكاريد الليبيدي (LPS) Lipopolysaccharides الذي يُعد المكون الأساسي للغشاء الخارجي وأحد أهم عوامل الفوعة للبروسيلا (Cardoso *et al*., 2006).



الشكل (1). صورة *B. abortus* RB51 ضمن البالعات الكبيرة. (A) بعد 5 ساعات من العدوى، (B) بعد 11 ساعة من العدوى (He, 2000). يشير السهم إلى مكان وجود البروسيلا.

تُعرف البروسيلا بمقدرتها الكبيرة على تحمُّل تغيرات الوسط الخارجي، حيث إنها تستطيع العيش في الماء والتربة والحليب والجبن والصوف لعدة شهور لتوفر الظروف البيئية الرطبة الدافئة، إضافةً إلى مقدرتها على البقاء في صنابير المياه لأكثر من 60 يوماً، إلا أنها لا تتحمّل درجات الحرارة العالية وتموت فوراً بالغليان (Samaha *et al*., 2008).

يتضمن جنس البروسيلا ثمانية أنواع (الجدول 3)، ستةٌ منها تصيب الثدييات البرية (أربعةٌ منها فقط ممرضة للإنسان) واثنتين منها تصيب الثدييات البحرية (Godfroid *et al.*, 2005)، يعتمد هذا التصنيف بشكلٍ أساسي على اختلاف القدرة الإمراضية للإنسان وعلى المضيف المفضل لها (Lucero *et al.*, 2006; Moreno *et al.*, 2002).

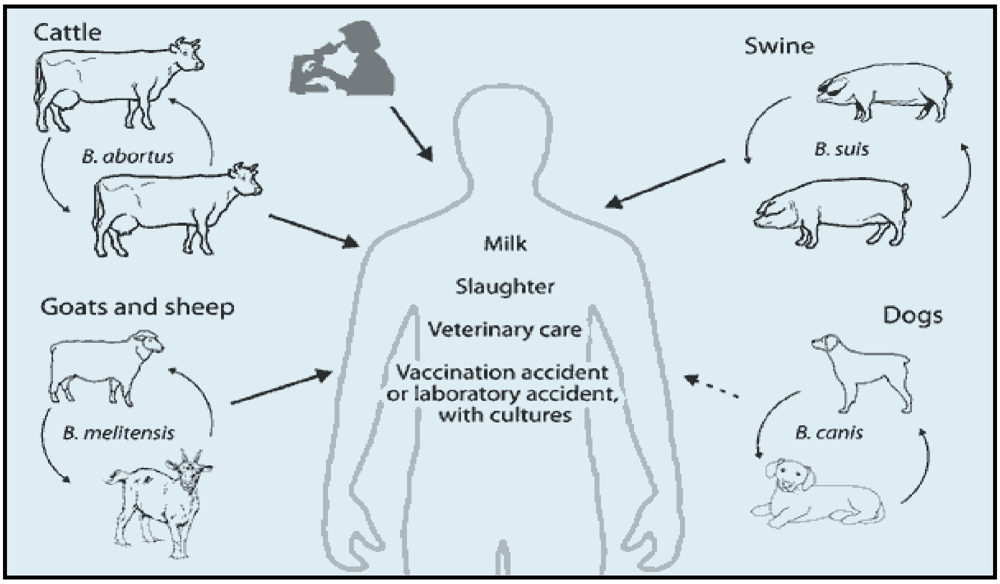
الجدول (3). المضيف المفضل لمختلف أنواع البروسيلا ودرجة إمراضيتها للإنسان.

أنواع البروسيلا	المضيف الحيواني	الإمراضية للإنسان
البروسيلا الخنزيرية *B. suis*	الخنازير	شديدة
البروسيلا الضأنية *B. melitensis*	الأغنام والماعز والجمال	شديدة
البروسيلا المجهضة *B. abortus*	الأبقار	متوسطة
البروسيلا الكلبية *B. canis*	الكلاب	متوسطة
البروسيلا الغنمية *B. ovis*	الأغنام والماعز	لا توجد
بروسيلا جرذ الصحراء *B. neotomae*	القوارض	لا توجد
B. cetaceae *B. pinnipediae*	الثدييات البحرية	غير معروفة

5.2.1. الوبائية: Epidemiology

يعتبر هذا المرض من أهم الأمراض المشتركة بين الإنسان والحيوان في العالم، ويُصنف ضمن الأمراض المهنية المزمنة التي تصيب العاملين في المزارع وتربية الحيوانات، والرعاة وفنيي المختبرات والأطباء البيطريين، كما يُعد تناول الحليب الملوث ومنتجاته من الأسباب الرئيسية للإصابة بالمرض (Boschiroli *et al.*, 2001). يكون انتقال العدوى للإنسان إما بالاتصال المباشر للإنسان مع البروسيلا أثناء حلب أو تنظيف الحيوان المصاب عندها تخترق هذه البكتيريا الجلد البشري عبر الجروح والندوب الموجودة، أو من خلال عاداتٍ غذائية خاطئة منها شرب الحليب غير المغلي والمأخوذ من حيواناتٍ مصابة، أو تناول منتجات الألبان المصنوعة من ذلك الحليب أو أكل اللحومِ المصابةِ نيئةً (Young, 2005)، أو عن طريق التطعيم بالسلالة اللقاحية للبروسيلا (Nicoletti *et al.*, 1986). إن إمكانية انتقال البروسيلا من إنسان مصاب لآخر سليم لم تثبت بعد، رغم إصابة بعض الأشخاص بها عن طريق نقل دم ملوث أو زرع نقي العظم. كما أنه من الممكن انتقال العدوى من الأمهات المصابات إلى أولادهم أثناء عملية الولادة أو الرضاعة (Al-Tawfiq, 2006; Young and Bennetts, 2000)، إضافةً إلى احتمال انتقالها عبر الاتصال الجنسي (Wyatt, 1996).

تنتقل العدوى للحيوان إما عن طريق التماس مع حيوان آخر مصاب أو تناول غذاء ملوث بالبروسيلا، أو دخول البكتيريا عن طريق العين أو الجلد (الشكل 2)، تُسبب هذه العدوى في المضيف الطبيعي الإجهاض لدى إناث الحيوانات الحوامل وذلك نتيجة حدوث عددٍ من التفاعلات المعقدة ضمن خلايا أنسجة المشيمة المصابةِ بالبروسيلا والجنين، إضافةً إلى أنها تسبب التهاب البربخ والخصية مما يؤدي إلى عقم الحيوان المصاب، وذلك بعد فترةِ حضانةٍ تستغرق نحو ثلاثة أسابيع حيث تُطرح البروسيلا بكمياتٍ كبيرةٍ في الحليب والبول ومخلفات الولادة (Corbel, 1997b).



الشكل (2). طرق انتقال العدوى بالبروسيلا من حيوان لحيوان ومن الحيوان للإنسان.

يتميز الداء بطوره الحاد عند الانسان بظهور أعراض غير نوعية كآلام المفاصل والعضلات والقشعريرة والعرق الشديد إضافةً إلى نقصٍ في الشهية والوزن والعصبية والأرق والصداع وغير ذلك من الأعراض (Almuneef and Memish, 2003; DelVecchio *et al*., 2002a). لا يُعد المرض قاتلاً بشكل عام إلا أن الحمى المتموجة المرافقة له تكون مضنيةً ومرهقةً للجسد، ولكن في حالات نادرة يمكن للمرض أن يُصبح بالغ الخطورة مما يؤدي إلى حدوث مضاعفاتٍ قاتلةٍ مثل: الالتهاب الرئوي Pneumonia أو إلتهاب السحايا البكتيري Bacterial meningitis، إضافةً إلى إلتهاب القصبات الهوائية Bronchitis وإلتهاب شغاف القلب Pericardium inflammation والتي تكون مسؤولةً عن أغلب الوفيات المرتبطة بالبروسيلا (Young, 2005; Corbel and Banai, 2005; Comerci *et al*., 2001).

6.2.1. الإمراضية: Pathogenesis

تختلف سلسلة التفاعلات بين المضيف وبكتريا البروسيلا التي تحدث عند الإنسان في العديد من مراحلها عن آلية الإمراضية التي تمَّ رصدها للمرة الأولى عند الحيوانات، لذلك فإن البروسيلا تُعد فريدةً بالعديد من النواحي حيث إنها لا تظهر عوامل الفوعة التقليدية مثل الذيفانات الداخلية والخارجية والخلايا الحالة cytolysin والبلاسميدات، إضافةً إلى أنها تمتلك المقدرة على تجنب ومقاومة المضيف من خلال تثبيط آليات الموت المبرمج للخلايا (Detilleux *et al.*, 1991).

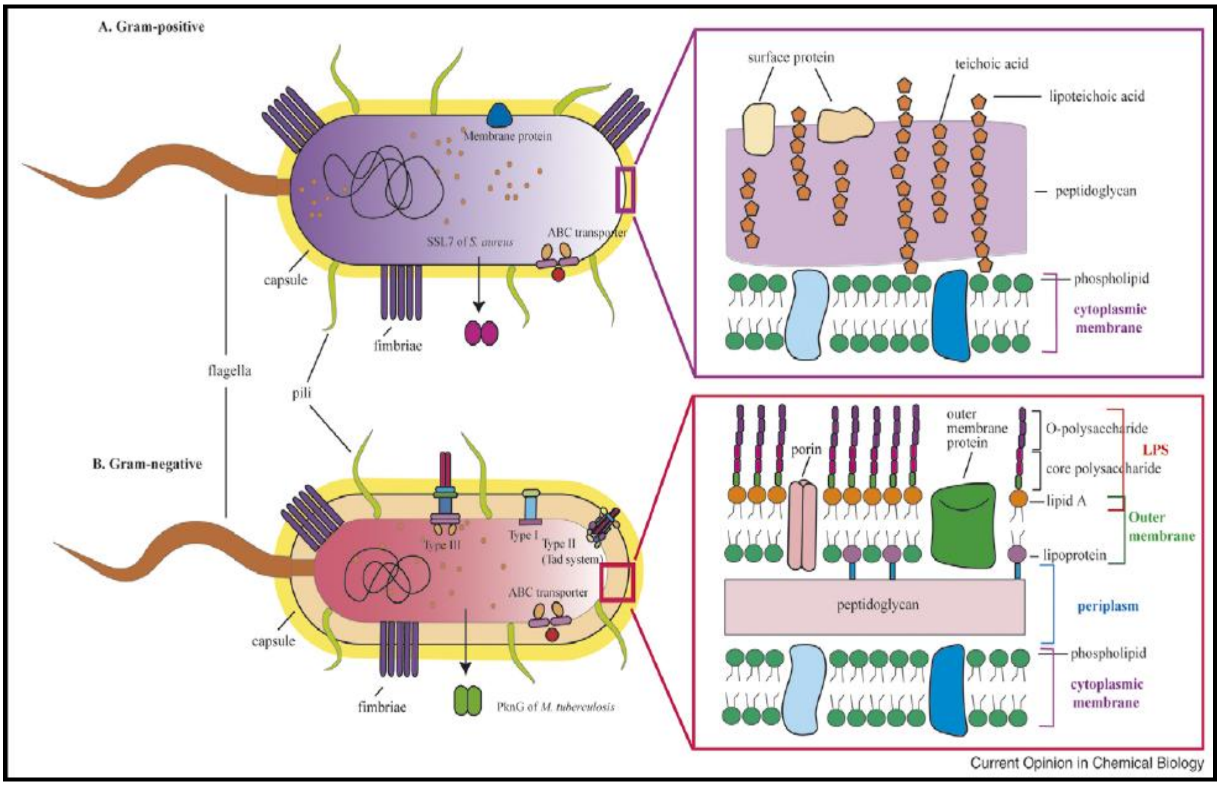
تمتلك البروسيلا المقدرة على العيش والتكاثر ضمن العديد من الخلايا، مثل: الخلايا الظهارية والأرومة المغذية للمشيمة Placental trophoblasts والخلايا المتغصنة Dendritic cells والبالعات الكبيرة (Gorvel, 2008) حيث إنها لا تهرب من البلعمة، ووفقاً لـ Spink عام (1956) فإن بلعمة البروسيلا بواسطة البالعات الضخمة والخلايا متعددة النوى Polymorphonuclear (PMN) من الممكن أن تكون وسيلةً لحماية وانتشار البروسيلا ضمن المضيف لأنها تؤمن للبروسيلا ملجأً آمناً من المضادات الحيوية والأضداد، وبما أن البروسيلا غير متحركة لذلك يسهل ابتلاعها من قبل البالعات في المراحل الأولى من العدوى، ثم تنفجر تلك الخلايا نتيجة النمو السريع للبروسيلا داخلها، وتقوم البروسيلا المتحررة بمهاجمة خلايا أخرى في العقد اللمفاوية القريبة، حيث تبدأ البروسيلا باستيطانها والتضاعف ضمن أجزاء الجسيمات الحالة phagolysosom (Arenas *et al.*, 2000; Cheers *et al.*, 1980). تصل البروسيلا فيما بعد عبر السائل الليمفاوي والدم إلى مختلف مناطق الجسم خصوصاً الضرع والطحال وسائل المفاصل إضافةً إلى أنها تفضل البقاء في رحم الحامل حيث تبين وجود مادة سكرية مركبة، هي الأريثريتول Erythritol والتي تنعش البكتريا وتساعدها على التكاثر، تكثر هذه المادة في مشيمة ودم الحيوانات الحوامل، لذلك فإن البروسيلا تهاجم المشيمية بضراوة لتتغذى على الأريثريتول الموجود مسببةً تلفاً للمشيمة وتهتكاً لأنسجتها، مما يؤدي إلى حدوث الإجهاض. مؤخراً حدد كل من Sangari و DelVecchio وزملائهم المورثات المسؤولة عن مسلك استقلاب سكر الأريثريتول لدى البروسيلا. وافترضوا أن غياب هذا السكر من مشيمة البشر، والجرذان والفئران والأرانب، يمكن أن يفسر ندرة إصابة الأجهزة التناسلية لهذه الكائنات بالبروسيلا حيث يُلاحظ وجود هذا السكر في الماشية والأغنام والخنازير (DelVecchio *et al.*, 2002a; Sangari *et al.*, 2000)، إلا أنه تبين بعد ذلك أن حذف المورثة المسؤولة عن استقلاب سكر الأريثريتول لدى بعض السلالات لم يظهر فرقاً مقارنةً بالسلالات البرية للبروسيلا (Elzer, 2002). مما يدل على أن مقدرة البروسيلا على استقلاب هذا السكر ليس عاملاً محدداً لاستيطان المشيمة من قِبل البروسيلا.

إن دخول البروسيلا بالطور المزمن للعدوى يعكس حقيقة انتمائها إلى الطفيليات الداخل خلوية الإختيارية وذلك لمقدرتها على العيش ضمن خلايا المضيف بعد بلعمتها نتيجةً لتكيفها مع الشروط الداخل خلوية إضافةً إلى السيطرة على الآليات الدفاعية للمضيف (Baldwin and Goenka, 2006)، وبالتالي فإن فوعة البروسيلا تعتمد على مقدرتها دخول واستيطان الخلايا حيث تتضاعف ضمنها مدمرةً الاستجابة المناعية الطبيعية والنوعية للمضيف وذلك لتوسيع نطاق فوعتها. لم يتم بعد فهم الآلية الوراثية لهذه الظاهرة جيداً، إلا أن اكتشاف المورثات المساهمة في انهيار الجهاز المناعي له أهمية أساسية في فهم فوعة البكتريا وآلية إحداثها للمرض إضافةً إلى إمكانية تصميم لقاحات فعالة.

7.2.1. الفوعة والجينوم: Virulence & genome

كما هو الحال لدى معظم البكتيريا تبين أن السَلسلة الكاملة للجينوم تمنح فرصةً كبيرةً في فهم فوعة البكتريا وآلية إحداثها للمرض إضافةً إلى تفاعلاتها ضمن المضيف، فقد تمَّ في مطلع هذه الألفية سَلسلة جينوم البروسيلا الضأنية 16M والذي أُتبع بعد عدة أشهر بإصدار تسلسل جينوم البروسيلا الخنزيرية (DelVecchio *et al.*, 2002a)، وعند مقارنة جينوم كلا النوعين تبين وجود تشابه كبير بأغلب المورثات والذي يبلغ تقريباً > 90%، يشتمل هذا التشابه على تشابه في التسلسل والتنظيم والوظيفة، ولكن لا يخلو الأمر من وجود تباينـاتٍ فريدةٍ مميزةٍ على طول الجينوم لكل نوعٍ من الأنواع. كانت هذه المعلومات مترقبة منذ فترة طويلة من قِبل الباحثين في هذا المجال على أمل أن يتَوضح سِرُّ فوعة البروسيلا بمعرفةِ تسلسلها، إلا أن المدهش في الأمر أن هذه السَلسَلة كشفت امتلاك البروسيلا القليل من مورثات الفوعة التقليدية مما أكسبها لقب " furtive nasty bug " أي البكتريا كامنة الخطورة (Gorvel and Moreno, 2002).

من أهم الصفات التي تميز البروسيلا عن باقي البكتيريا أنها تفتقر إلى التتاليات المورثية المرتبطة بعواملِ الفوعةِ التقليدية المعروفة مثل: المحفظة، الأهداب Fimbria، الذيفانات الخارجية، البروتياز الخارجي، إضافةً إلى الخلايا الحالة والبلاسميدات والتبديل المستمر للمستضدات...وغيرها (الشكل 3) (Roop *et al.*, 2004; DelVecchio *et al.*, 2002b).



الشكل (3). عوامل الفوعة الأساسية للبكتريا الممرضة. A: ايجابيات غرام، B: سلبيات غرام (Wu *et al*., 2008).

1.7.2.1. جينوم البروسيلا: *Brucella* genome

يتضمن جينوم البروسيلا الضأنية 16M نحو 3,294 kb موزعة على صبغيين حلقيين يبلغ حجم الأول 2,117 kb في حين يبلغ حجم الآخر 1,177 kb تقريباً، واللذين يرمزان لنحو 3,197 مجالاً مفتوحاً للقراءة (**O**pen **R**eading **F**rames) ORFS (Halling *et al*., 2005). محتوى الدنا من الغوانين/سيتوسين (G/C) لمختلف أنواع البروسيلا متماثل تقريباً حيث يتراوح بين 55-58% (Verger *et al*., 1987). تتوزع مورثات الـ Housekeeping Genes بالتساوي على طول الجينوم وهي المورثات التي تساهم في تضاعف الدنا والنسخ والترجمة والاستقلاب المركزي إضافةً إلى مورثات التركيب الحيوي للجدار الخلوي (DelVecchio *et al*., 2002a)، الأمر الذي يجعل مقدرة البروسيلا على التعايش ضمن مضيفها كبيرة (Moreno and Moriyon, 2002). أظهرت الخريطة الصبغية وجود مواقع محددة ثابتة لدى كل نوع، إلا أن الاختلاف بينها يتمركز في بعض المواقع الموجودة غالباً في الصبغيات الصغيرة.

2.7.2.1. مورثات الفوعة عند البروسيلا: *Brucella* Virulence Genes

تُعّرف الفوعة عند الأحياء الدقيقة بمقدرتها على غزو الآليات الدفاعية للمضيف. فرغم أن البروسيلا تبدي العديد من الميزات التي تبديها مسببات المرض الداخل خلوية مثل المقدرة على العيش والتكاثر ضمن الجسيمات البالعة Phagosome وتثبيط الإشارات الخلوية إلا أن المورثات الأساسية المسؤولة عن الفوعة لم تُكتشف بعد (Robertson *et al*., 2000; Smith and Ficht, 1990).

لقد كان لسَلسلة جينوم البروسيلا الضأنية من قِبل DelVecchio وزملائه دوراً كبيراً في تحديد وإثبات وجود عوامل الفوعة وغيرها من المورثات الضرورية المساهمة في ذلك، وعلى غرار معظم الأنواع البكتيرية الأخرى تستخدم البروسيلا بعض الأنزيمات المتخصصة، والتي يُعتقد أنها غير ضرورية من أجل الفوعة إلا أنها هامة في الحماية والترميم في ظل الظروف القاسية الداخل خلوية، حيث ترمز البروسيلا الضأنية بروتينات إصلاح الدنا وحموضاً أمينية ومغذيات وناقلات معدنية (DelVecchio *et al*., 2002 a,b).

ساعدت التقنيات الوراثية مؤخراً في استعمال جينوم البروسيلا لتحديد هوية عوامل الفوعة للبروسيلا على المستوى الوراثي، حيث يعتمد كشف عوامل الفوعة على تنسيل وسَلسَلة وتطفير مورثة الفوعة، إضافةً إلى العدوى بعد إحداث الطفرة إما في الزجاج *In vitro* أو داخل الجسم الحي *In vivo*، إلا أن هذه المقاربة لا تفسر العديد من عوامل الفوعة لدى البروسيلا، حيث إن هنالك العديد من عوامل الفوعة التي تمَّ كشفها لدى مسببات المرض البكتيرية الداخل خلوية الأخرى ليس لها أهمية في الفوعة لدى البروسيلا، مما يدل على وجود تفاعلاتٍ فريدةٍ بين مسبب المرض والمضيف لدى مرضى البروسيلا.

- **من هذه المورثات:**

1. **المورثات المساهمة في اصطناع الـ LPS**، مثل: Phosphoglucomutase (*pgm*) (Ugalde *et al*., 2000)، و perosamine synthetase (*rfbE*) (Godfroid *et al*., 1998)، ومورثة الـ *manB* (Kohler *et al*., 2002).
2. **المورثات المساهمة في اصطناع الجدار الخارجي** Outer membrane genes (OMPs)، مثل: OMP31 (Vizcaino *et al*., 1996).
3. **المورثات المساهمة في الاجهادات**، مثل: Host factor-1(*hfq*) (Robertson and Roop; 1999)، و Lon protease (*lon*) (Robertson *et al*., 2000)، و High-temperature-requirement A (*htrA*) (Roop *et al*., 2001)، Cu/Zn superoxide dismutases (*sod*) (Gee *et al*., 2005).

عموماً بدأت الدراسات الوراثية التقليدية لمورثات البروسيلا في نهاية القرن الماضي وذلك بإحداث طفرات عشوائية spontaneous mutantions، ركزت هذه الدراسات بدايةً على النمط الظاهري والثبات والاستقلاب إضافةً إلى فوعة السلالات الطافرة (Halling *et al.*, 1991). اتجهت هذه الدراسات فيما بعد نحو دراسة المورثات المرمزة للبروتينات المسؤولة عن الفوعة عند البروسيلا إما عن طريق عزلها أو تطفيرها ومن ثم التعبير عنها، مثل: الـ *manB* (Kohler *et al.*, 2002)، والـ *htrA* (Roop *et al.*,2001)، والـ *p39* (Almariri *et al.*, 2001a)، exsA (Rosinha *et al.*, 2002). إلا أن هنالك العديد من المورثات الافتراضية التي تم تحديدها ضمن جينوم البروسيلا مقارنةً مع المتعضياتِ الأخرى ولكن لم تتم دراستها من خلال عزلها والتعبير عنها، مثل مورثات الـ *dsbA, pheB, zwf* إضافةً إلى المورثة المرمزة لبروتين الزنك بروتياز zinc protease (Delrue *et al.*, 2004).

8.2.1. لقاحات البروسيلا: *Brucella* Vaccines

تركزت الجهود على تطوير لقاح فعلي منذ المراحل المبكرة لظهور هذا الداء، وكان الهدف هو إنتاج مستضدات غير ضارة للحيوانات والانسان عند حقنها بها مع درجة كفاءة عالية ومناعة مديدة، إضافةً إلى تكاليف إنتاج منخفضة وسهلة القياس بحيث لا تتداخل مع الاختبارات التشخيصية. ولكن لسوء الحظ لم يتحقق ذلك بشكلٍ كامل حتى الآن. أُنجزت المحاولة الأولى لاستخدام لقاحات البروسيلا عام 1906 عن طريق Bang، وتتوافر حالياً ثلاثة سلالات للقاح فقط وهي: (*B. abortus* S19, RB51 strains, *B.melitensis* Rev1) والتي تمت الموافقة عليها من قِبَل المنظمة العالمية للأوبئة الحيوانية من أجل استخدامها في السيطرة على داء البروسيلات في المواشي (Garin-Bastuji and Blasco, 2008; Nielsen and Ewalt, 2008)، إلا أن هذه اللقاحات قد تكون ممرضةً للبشر (Godfroid *et al.*, 2005).

1.8.2.1. اللقاحات الحية الموهنة: Attenuated Vaccines

تم اختبار دور اللقاحات الحية الموهنة والمقتولة في السيطرة على داء البروسيلات وإبادته في الأبقار والأغنام والخنازير. وقد تبين أن اللقاحات الحية الموهنة تمتلك ميزاتٍ أخرى إضافةً إلى مقدرتها على القتل، حيث تميل المناعة الناشئة عنها لأن تكون خلوية الوساطة ودائمة خلافاً للقاحات المقتولة، كذلك ستتمكن هذه اللقاحات الحية من التضاعف ضمن خلايا المضيف مما يجعلها أقل كلفة. إن استخدام السلالات الحية الموهنة يساعد في السيطرة على داء البروسيلات والوقاية منه.

1.1.8.2.1. لقاحات البروسيلا المجهضة: *Brucella abortus* Vaccines

- السلالة *B. abortus* strain 19 (S19)

هذه السلالة ملساء ولكنها موهنة، إلا أن سبب هذا الوهن مجهول. تعد سلالة البروسيلا المجهضة S19 من اللقاحات الأساسية المستخدمة في برامج القضاء على داء البروسيلات لدى الأبقار في الولايات المتحدة. ومع ذلك، لهذه السلالة بعض المشكلات منها اقتصار استخدامها على المواشي فقط إضافةً إلى أنها من الممكن أن تسبب إجهاضاً عند حقنها بجرعاتٍ كبيرة.

- السلالة *B. abortus* strain RB51

هذا اللقاح عبارة عن طفرة خشنة للبروسيلا المجهضة سلالة 2308، ثابتة، مقاومة للرفامبين Rifampin، تفتقر طبقة الـ LPS لسلالة RB51 للسلسلة O خلافاً للسلالة الأبوية 2308، بُرهن على ثبات هذا اللقاح وفاعليته في المخابر وفي الكائن الحي (في الفئران والمواشي) (Cheville *et al.*, 1993). وفي فبراير 1996 تمت الموافقة على استخدام البروسيلا المجهضة RB51 كلقاح رسمي للوقاية من داء البروسيلات، من المزايا التي تتمتع فيها هذا اللقاحات مقارنةً مع اللقاحات الأخرى، أنه لا ينتج عنها أي اختلاطات طبية إضافةً إلى عدم تحسس مكان الحقن (Cheville *et al.*, 1993). كما أنها لا تحرض تشكل أضداد ضد مستضدات LPS للبروسيلا (Moriyon *et al.*, 2004)، وتزول من المجرى الدموي بعد أسبوعين تقريباً من الحقن، إضافةً إلى أنها لاتُطرح عن طريق الافرازات الأنفية أو اللعاب أو البول، لذلك لا يمكن للمتعضية الانتقال من الحيوانات الملقحة إلى الحيوانات غير الملقحة.

2.1.8.2.1. لقاحات البروسيلا الضأنية: *B. melitensis* Vaccines

- السلالة *B. melitensis* Rev. 1.

تُعتبر سلالة البروسيلا الضأنية (Rev1) حالياً اللقاح الوحيد المعتمد للوقاية من العدوى بالبروسيلا الضأنية (Al-Mariri, 2010) وهي عبارة عن طفرة مستقلة عكوسة معتمدة على الستروبتومايسين، ففي عام 1957 تم عزل هذه السلالة الملساء الموهنة من تجمعات للستربتومايسين نمت على وسط يفتقر للستربتومايسين (Elberg *et al.*, 1957).

إن استخدام هذه السلالة كلقاح له فائدتين وسيئتين، فالتلقيح بالـ Rev1 يُحفز المناعة عند الأغنام (Alton, 1987). كما تبين أنه أكثر فاعلية عند الأغنام المصابة بالبروسيلا الضأنية مقارنة بتلك

الحيوانات الملقحة بالسلالة S19 (Morgan *et al.*, 1966). بالمقابل لهذا اللقاح بعض السيئات وهي أنه يسبب الإجهاض عند تلقيح الحيوانات الحوامل، إضافة إلى أن استخدام هذا اللقاح من الممكن أن يُبقي راصات والتي من الممكن أن تتداخل مع العديد من الاختبارات التشخيصية (Al-Mariri, 2010; Adams, 1990).

2.8.2.1. اللقاحات المقتولة: Killed Vaccines

توفر اللقاحات المقتولة حمايةً من المرض إضافةً إلى كونها آمنة للحيوانات الفتية أو المثبطة مناعياً Immunosuppressed أو الحوامل. فمنذ سنوات عديدة تم تطوير العديد من اللقاحات المقتولة للوقاية من داء البروسيلات إلا أن نجاحها في ذلك كان محدوداً جداً.ولم يُظهر أي منها وقاية من اللقاحات الحية الموهنة، مثل: البروسيلا المجهضة 45/20 والبروسيلا الضأنية H38 (Corbel, 1997c). تُحفز هذه اللقاحات المقتولة 45/20 وH38 الاستجابة المناعية الخلطية وبالتالي فإن نسبة الأضداد الناتجة تبقى لفترات طويلة إضافةً إلى أنها من الممكن أن تتداخل مع الاختبارات المصلية الشائعة (Chukwu, 1985)، كما تحدث آفاتٍ مكان التلقيح.

3.8.2.1. لقاحات الدنا: DNA Vaccines

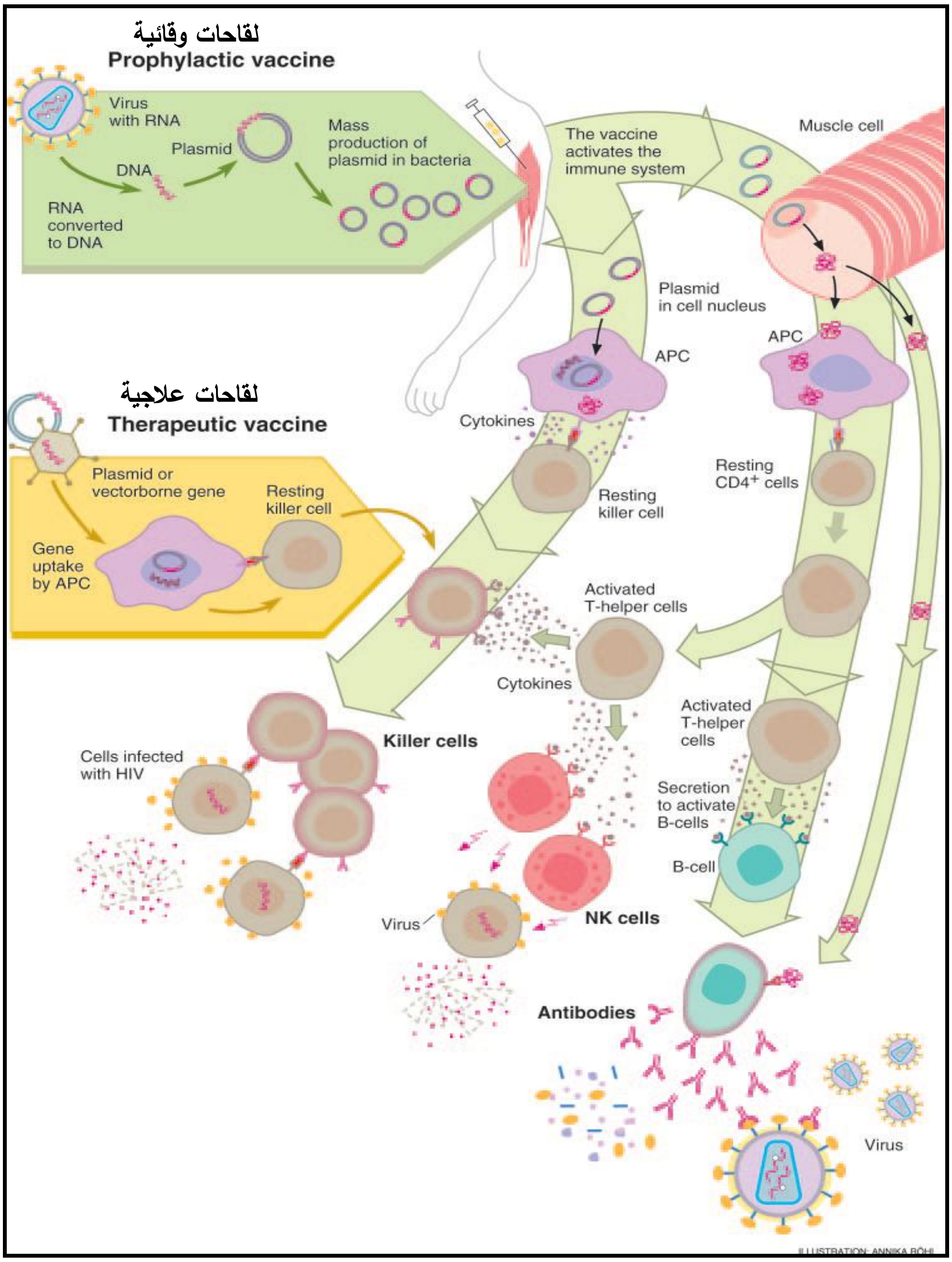
تعد لقاحات الدنا طريقة حديثة وفعالة نسبياً للتمنيع، حيث تقوم بتحفيز الاستجابة المناعية الخلطية والخلوية للوقاية من العديد من مسببات المرض (Donnelly *et al.*, 2005). واعتماداً على نجاح هذه اللقاحات تجاه العديد من الممرضات داخل الخلوية، تمَّ تطوير عدد من لقاحات الدنا ضد داء البروسيلات (Hu *et al.*, 2009). تعتمد هذه اللقاحات على حقن المضيف ببلاسميد يحمل تسلسل المورثة المرمزة للمستضد المحفز للاستجابة المناعية (Klinman *et al.*, 1997)، وعندما يصل إلى دنا الخلية المضيفة يتحد معها ويُعبر فيها عن المستضد المرغوب الذي يعمل على تحفيز المناعة الخلوية أو الخلطية أو كليهما (الشكل 4). لا تسبب هذه اللقاحات أية إمراضية لخلوها من المورثات اللازمة لنسخ وتضاعف العامل المسبب للمرض، إضافةً إلى أن المناعة التي توفرها تستمر مدى الحياة.

من لقاحات الدنا التي تم إحداثها ضد البروسيلا المجهضة باستخدام غليسر ألدهيد-3- فوسفات دي هيدروجيناز glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (Rosinha *et al.*, 2002)، المورثة المرمزة لبروتين الصدمة الحرارية *GroEL* (Leclerq *et al.*, 2002)، مورثة الباكتريوفيرين أو *P39* (Al-Mariri *et al.*, 2001b)، في حين تمثل مورثة الـ *omp 31* لقاح الدنا المأخوذة من البروسيلا الضأنية.

مؤخراً، تمَّ تشكيل لقاح للدنا مؤلف من اتحاد ثلاث مورثات مرمزة لبروتينات الـ BCSP31 والـ SOD والـ L7/L12 الريبوزومي، وذلك من أجل تحسين فاعلية لقاح الدنا للبروسيلا المجهضة (Yu *et al*., 2007).

4.8.2.1. لُقاحات البروتينات المؤشبة: Recombinant proteins Vaccines

تُعد اللقاحات المؤشبة الفعالة غير الممرضة والتي بإمكانها تحفيز استجابة مناعية فاعلة مفيدةً جداً في السيطرة على داء البروسيلات والوقاية منه. ولانجاز ذلك يجب اكتشاف مستضدات تمتلك المقدرة على إثارة الاستجابة المناعية للمضيف. وبحلول تقانة الدنا المؤشب تمَّ تنسيل بعض مورثات البروسيلا والتعبير عنها للحصول على البروتين المرغوب بشكلٍ نقي ومن ثمَّ استخدام هذا البروتين كمستضد تأشيبي قادر على تحريض الاستجابة المناعية الخلطية، بالإضافة إلى الاستجابة خلوية الوساطة، من هذه البروتينات المؤشبة: بروتين Cu/Zn SOD (Tabatabai and Pugh, 1994) وبروتين L7/L12 (Oliveira and Splitter, 1996) وبروتين الـ OMP31 (Vizcaino *et al*., 1996) وبروتين الـ P39 (Al-Mariri *et al*., 2001a).



الشكل (4). لقاحات الدنا. يتم إدخال البلاسميد المؤشب إما عن طريق حقنه بالجلد أو بالأغشية المخاطية، حيث يدخل البلاسميد إلى نواة الخلية، ليتم فيها بدء عملية انتساخ المورثة والذي يتبع بإنتاج البروتين في السيتوبلازما. تعمل هذه البروتينات المفرزة على تحفيز السيتوكينات والتائيات المساعدة إضافةً إلى الأضداد. تعرض الخلايا المقدمة للمستضد الببتيدات على سطحها مرتبطةً بمعقد التوافق النسيجي الكبير للفرد الملقح مما يحفز السيتوكينات والخلايا القاتلة على حلّ الخلايا المخموجة (Donnelly *et al.*, 2005).

9.2.1. البروتينات المؤشبة: Recombinant Proteins

لقد أصبح للتعبير عن بروتينات محددة بكمياتٍ كبيرة أهميةً بالغةً أكثر من أي وقت مضى، خصوصاً في الأبحاث العلمية والمجالات الأكاديمية إضافةً إلى استخداماتها الصناعية والصيدلانية والتي لا تقدر بثمن (Schmidt, 2004). وبما أن البكتريا الأم تنتج البروتين بكمياتٍ قليلة، إلا أنه من الممكن تجاوز هذه المشكلة بواسطة التعبير المتغاير Heterologous overexpression عن البروتين الهدف ضمن نوع بكتيري آخر والذي غالباً ما يكون الـ *E. coli*.

دُرست بكتريا الـ *E. coli* بشكلٍ جيد منذ عقودٍ عديدة، وقد ثبت أنها أفضلُ أنظمةِ بدائيات النوى للتعبير عن المورثات الغريبة، لذلك ليس من المستغرب أن تتم أولى محاولات إنتاج كمياتٍ كبيرة من البروتينات المرمَزة من مورثات معينة في خلايا الـ *E. coli*. فمنذ أن أصبحت تقانات الدنا المؤشب متاحة، استخدمت هذه الخلايا بشكلٍ واسعٍ كسلالاتٍ رائدةٍ في مجال التعبير البروتيني. ومقارنة بخلايا حقيقيات النوى تمتلك الـ *E. coli* العديد من الميزات التي تجعلها مناسبةً ومثالية للتعبير عن العديد من الأنواع البروتينية، منها: أن لها دورة حياة قصيرة جداً والتي تبلغ 20 دقيقة لكل جيل، كما أنه من السهل التعامل مع مورثاتها للحصول على إنتاجٍ للبروتين الهدف ليشكل 30% من البروتينات الكلية، إضافةً إلى نموها السريع على أوساطٍ غير مكلفة. جميع هذه الميزات جعلت الـ *E. coli* المضيف الأمثل للتعبير عن معظم البروتينات.

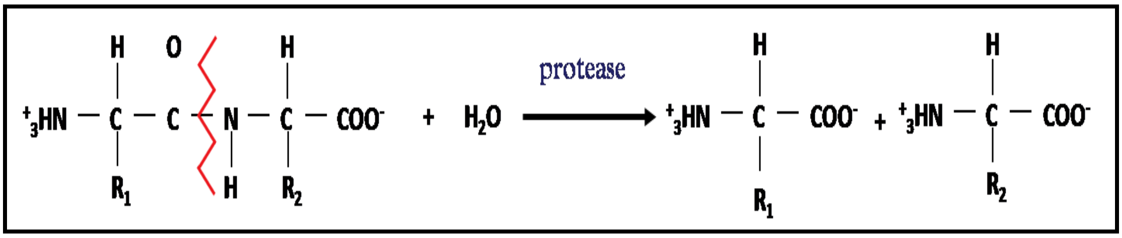
وبالرغم من جميع هذه الميزات لا تخلو هذه الخلايا من بعض العيوب، منها: أن البروتينات التي يتم التعبير عنها بكمياتٍ كبيرة ضمن هذه البكتريا يتم تجمعها بشكل حبيبات غير منحلة تدعى بالأجسام الضمينة Inclusion bodies، وبالتالي لا يمكن الحصول على هذه البروتينات بشكلها الفعال إلا من خلال حلها solubilization بعوامل ممسخة Denaturing agents ومن ثم إعادتها لوضعها الطبيعي Renaturation بعناية. كما أنه عند التعبير عن مورثات حقيقيات النوى ضمنها، فإن البروتينات الناتجة لا تخضع للتعديلات التي تلي عملية الترجمة، فإذا كانت هذه التعديلات ضرورية من أجل الفاعلية الحيوية للبروتين يفضل عدم استخدام أنظمة التعبير البكتيرية لإنتاج البروتينات الهدف. ولحسن الحظ تم تطوير أنظمةٍ للتعبير عن مورثات حقيقيات النوى لتجاوز هذه المشكلة، أحد هذه الأنظمة المعروفة هي الخميرة Pichia، والتي تتميز عند مقارنتها مع غيرها من خلايا حقيقيات النوى بسهولة نموها بتكاليف منخفضة (Schmidt, 2004). وبالرغم من تزايد المقالات التي تصف نجاح التعبير عن مورثة معينة ضمن هذا النظام إلا أنه يبقى لكل مورثة مشاكلَ تعبيرٍ خاصة بها، وبالتالي ليس هناك طريقة مخبرية محددة تضمن نجاح عملية التعبير.

إن المقاربة الأساسية المستخدمة للتعبير عن المورثات الغريبة في الـ *E. coli*، تبدأ بإدخال المورثة ضمن ناقل تعبير والذي غالباً ما يكون البلاسميد، يحمل هذا البلاسميد بعض العناصر الأساسية، مثل:

1. محضض Promoter انتساخ يقوم بتنظيم التعبير عن المورثة أثناء التحريض لإنتاج كميات كبيرة من الـ mRNA للمورثة المنتسخة.
2. تتالي يتحكم بعملية الترجمة، مثل: Ribosomal binding site (RBS) و ATG initiator.
3. موقع متعدد التنسيل Multiple cloning site (MCS) لتسهيل تنسيل المورثة وإدخالها في مكانها الصحيح.
4. التسلسل المسؤول عن منح صفة المقاومة والتي تعمل على بقاء البلاسميد ضمن الخلايا.
5. التسلسل المرمز لمتعدد ببتيد يسهل عملية تنقية البروتين.

3.1. أنزيمات البروتياز: Protease

تشكل أنزيمات البروتياز عموماً مجموعةً كبيرةً من الأنزيمات واسعة الانتشار في الطبيعة كما توجد في العديد من الأحياء الدقيقة، تدعى أيضاً بالببتيداز peptidases أو البروتيناز proteinases (Barrett and McDonald, 1986) تبلغ نسبة هذه الإنزيمات في الجينوم البشري تقريباً 2%، في حين تشكل 1–5% من جينوم الكائنات الممرضة (Puente *et al*., 2003). وهي عبارة عن جزيئات تقوم بحلمهة الرابطة الببتيدية في البروتينات (Polgar, 1989)، تعتبر هذه العملية ضرورية من أجل اصطناع جميع البروتينات، والتحكم بحجومها، ومكوناتها وأشكالها، وحركيتها إضافةً إلى تخربها (Seife, 1997)، كما أنها تساهم في تنظيم العمليات الاستقلابية والتعبير الجيني، والإمراضية. غالباً ما يكون عمل هذه الأنزيمات انتقائياً، حيث يكون كل نوعٍ مسؤولاً عن شطر تتالي محددٍ من الحموض الأمينية في شروطٍ بيئيةٍ محددة (الشكل 5).



الشكل (5). آلية عمل أنزيمات البروتياز في تفكيك الرابطة الببتيدية في البروتينات.

1.3.1. تصنيفها ومصادرها:

صُنِفت أنزيمات البروتياز ضمن أنزيمات التحلل المائي Hydrolyses، إذ إنها تحفز تحلل الرابطة الببتيدية للبروتينات في مواقع مختلفة وتحت ظروفٍ مختلفة. وقد حازت هذه الأنزيمات على التسمية النظامية لها طبقاً للجنة الأنزيمات التابعة للاتحاد العالمي للكيمياء الحيوية (International Union of Biochemistry) عام 1991 (EC.3.4). تنتج أنزيمات البروتياز من مصادر مختلفة مثل النباتات والحيوانات والأحياء الدقيقة.

من الصعب تمييز أنواع البروتياز نتيجة لتنوع عملها وبنيتها. عموماً تصنف هذه الأنزيمات اعتماداً على أوزانها الجزيئية، وشحنتها والركيزة المناسبة عملها، إلا أنه مع ظهور البيولوجيا الجزيئية صنفت البروتياز إلى عوائل اعتماداً على الطبيعة الكيميائية للموقع الفعال، وآلية عملها إضافةً إلى علاقتهما مع البنية الثلاثية الأبعاد (Rao *et al*., 1998).

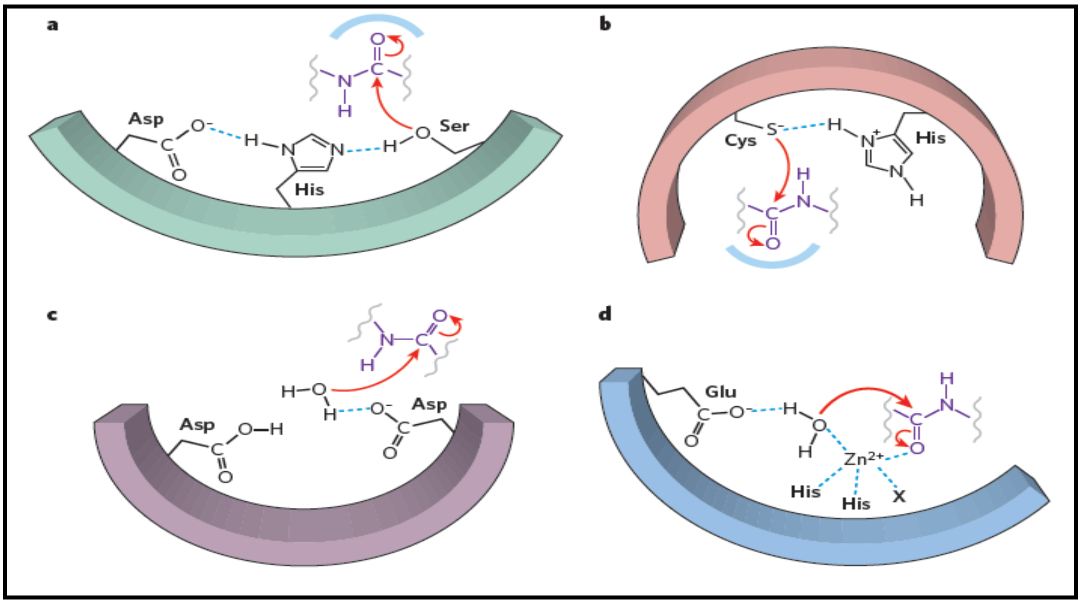
تنقسم البروتياز عموماً إلى مجموعتين رئيسيتين اعتماداً على موقع فاعليتها:

1. البروتياز الخارجية: Exopeptidase

وهي الأنزيمات التي تعمل على شطر الرابطة الببتيدية الموجودة في إحدى نهايتي السلسلة الببتيدية، وتقسم إلى: الـ Carboxypeptidase، وهي الأنزيمات التي تعمل على شطر الرابطة الببتيدية في النهاية الكربوكسيلة (C-terminal) للسلسة منتجةً حمضاً أمينياً مفرداً أو ببتيداً ثنائياً، والـ Aminopeptidase وهي الأنزيمات التي تعمل على شطر الرابطة الببتيدية في النهاية الأمينية (N-terminal) للسلسة منتجةً حمضاً أمينياً مفرداً أو ببتيداً ثنائياً أو أكثر (Felix and Brouillet, 1990).

2. البروتياز الداخلية: Endopeptidase

تعمل هذه الأنزيمات على شطر الرابطة الببتيدية ضمن السلسلة الببتيدية، وتصنف هذه الأنزيمات إعتماداً على الزمرة الوظيفية الموجودة في الموقع الفعال وآلية تفعيلها إلى خمسة صفوفٍ رئيسية: **أ.** السيرين بروتياز Serine proteases حيث يضم موقعها الفعال ثمالة السيرين **ب.** الأسباراتيك بروتياز Aspartic proteases حيث يضم موقعها الفعال ثمالة الأسباراتيك **ج.** السستئين بروتياز Cysteine protease حيث تحوي مجموعة SH في الموقع الفعال **د.** الثريونين بروتياز Threonine protease حيث يضم موقعها الفعال ثمالة الثريونين **هـ.** البروتياز المعدنية Metalloproteases والتي يضم موقعها الفعال جزيئة معدنية (Rawlings *et al.*, 2004) (الشكل 6).



الشكل (6). الموقع الفعال لبعض أنزيمات البروتياز، حيث يمثل (a) Serine proteases، (b) Cysteine protease، (c) Aspartic proteases، (d) Metalloproteases (Erez *et al.*, 2009).

2.3.1. البروتياز المعدنية Metalloprotease (EC.3.4.24):

هي البروتياز التي تحوي على أحد المعادن في موقعها الفعال والتي غالباً ما تكون جزيئة الزنك، إضافةً إلى جزيئات معدنية أخرى مثل المنغنيز والكوبالت والنحاس، تكون هذه الأنزيمات فعالة عند pH متعادل لذلك يطلق عليها أيضاً البروتياز المتعادلة، يعد هذا النوع من البروتياز من أقل البروتياز البكتيرية ثباتاً لذلك من الصعب التعرف على بعض خواصها مثل الوزن الجزيئي نتيجة التحلل الذاتي السريع. تثبط هذه الأنزيمات عند معاملتها بالعوامل المخلبية مثل EDTA.

إن معظم أنزيمات البروتياز المفرزة من قبل البكتريا تنتمي إلى صف البروتياز المعدنية والتي تحوي غالباً جزيئة الزنك في موقعها الفعال (Hase and Finkelstein, 1993)، تقسم البروتياز المعدنية إلى أربعة مجموعات اعتماداً على تخصص عملها، وهي: متعادلة (متخصصة تجاه الحموض الأمينية الكارهة للماء)، قلوية (لها مدى تخصص واسع)، Myxobacter I و(Myxobacter II متخصصة تجاه ثمالات الحموض الأمينية الصغيرة والحمض الأميني اللايسين على التوالي) (Kumar and Takagi, 1999).

تلعب هذه الأنزيمات أدواراً وظيفية هامة في دورة حياة الكائنات الحية، إلا أن الأنزيمات المفرزة من قبل الأحياء الدقيقة الممرضة خصوصاً الإنتهازية، تقوم أحياناً بدور العوامل السامة للمضيف حيث إنها تساهم في الفوعة والإمراضية (Miyoshi and Shinoda, 2000).

1.2.3.1. أنزيم الزنك بروتياز: Zinc protease

يُشكل أنزيم الزنك بروتياز المجموعة الأكبر من أنزيمات الزنك، حيث ينتشر بشكل واسع في بدائيات وحقيقيات النوى، كما يُعد أنزيم Carboxypeptidase A أول أنزيم تمَّ وصفه في هذه المجموعة (Vallee and Neurath, 1955) ، ومن ثمَّ حدث توسع لهذه المجموعة لتضم أكثر من 30 عائلة من الزنك بروتياز والتي تشكل خمس مجموعات كبيرة (Hooper, 1994).

1.1.2.3.1. الأهمية الحيوية للزنك:

- **أهمية الزنك في الكائنات الحية:**

تبين أن معدن الزنك ضروري من أجل نمو العديد من الكائنات إضافةً إلى دوره في عمليات التطور والتمايز للأحياء الدقيقة والنباتات والحيوانات (Vallee, 1986)، حيثُ يُعد ضرورياً للوظائف الفيزيولوجية للعظام والكلى والدماغ (Sly *et al*., 1983)، يؤدي عوز هذا العنصر إلى تأخر أو توقف النمو، بطء التحام الجروح، تساقط الشعر إضافةً إلى إعاقة عمليات الإنجاب.

استخدم هذا المعدن بنجاح في علاج العديد من الأمراض والاضطرابات، منها: التقزم Dwarfism، وعدم النضج الجنسي Sexual immaturity إضافةً إلى حالات القهم العصبي Anorexia nervosa والنهم العصبي Bulimia nervosa (Bryce-Smith, 1989).

- **أهمية الزنك في الأنزيمات:**

في عام 1940 تمّ اكتشاف أول أنزيم معدني يحوي على الزنك في الموقع الفعال (Keilin and Mann, 1940)، ومنذ ذلك الحين اكتشف أكثر من 300 أنزيم تنتمي إلى جميع الصفوف الأنزيمية. تعتبر ذرة الزنك عاملاً مساعداً ضرورياً للعديد من الوظائف البيولوجية للأنزيمات المعدنية.

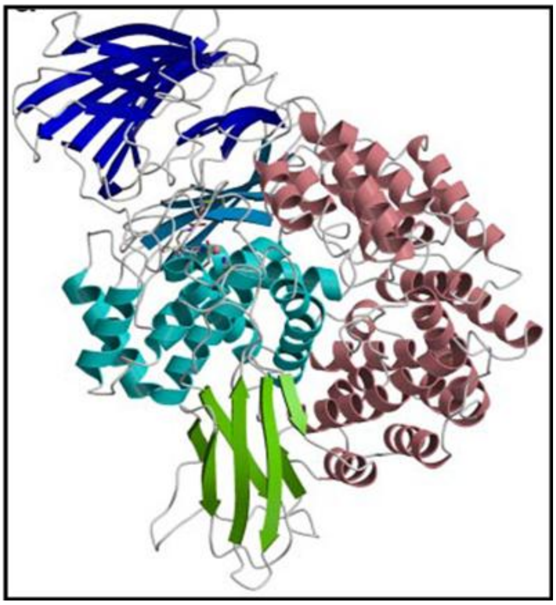
لا تعد فاعلية الزنك استثنائية مقارنة مع غيره من المعادن، إلا أن أيوناته تشغل المدار (d_{10}) وذلك خلافاً للصف الأول من المعادن، مثل: (Mn^{2+}, Fe^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, Cu^{2+})، لذلك فهي لاتساهم في تفاعلات الأكسدة والإرجاع Redox reactions إلا أنها تعمل كحموض لويس Lewis acid تسطيع استقبال زوج من الالكترونات (Williams, 1987). إن الافتقار إلى فاعلية الأكسدة والإرجاع يجعل أيون Zn^{2+} مستقراً في الوسط الحي، لذلك يُعد الزنك المعدن المثالي ليكون عاملاً مساعداً في التفاعلات التي تتطلب وجود أيونات ثابتة عند الأكسدة والإرجاع (Butler, 1998).

يتمثل دور الزنك في بعض البروتينات إما بكونه عامل محفز Catalytic أو مساعد على التحفيز Cocatalytic أو بنيوي Structural، حيث إن وجود الزنك في الموقع الفعال كمحفز تجعل أيون الزنك يساهم مباشرةً في خطوة تشكل الرابطة أو تفككها، في حين يتمثل الدور المساعد على التحفيز في وجود عدة أيونات معدنية مرتبطة مع بعضها ويقوم أحد هذه الأيونات بدور المحفز في حين يُحسن وجود الأيونات المتبقية الفاعلية التحفيزية للموقع الفعال .(Vallee and Auld, 1992a). أخيراً يلعب الزنك دوراً بنيوياً في أن أيوناته تعمل على استقرار البنية الثالثية Tertiary structure للأنزيم بشكل يشبه إلى حدٍ ما الروابط ثنائية الكبريت (McCall *et al*., 2000). في جميع الأحوال فإن إستبعاد أيون الزنك من الممكن أن

يؤدي إلى فقدان الفاعلية الأنزيمية. لذلك فإن فهم الدور الكيميائي الحيوي للزنك في الجزيئات الكبرية الحيوية يزيد من الارتباط بين الوظائف الكيميائية الحيوية الدقيقة والأنماط الظاهرية الوظيفية الممكن تشكلها.

2.1.2.3.1. البنية الفراغية ثلاثية الأبعاد: Three Dimensional structure

يتألف الأنزيم الناضج من عدد من الحموض الأمينية التي تشكل مجالين رئيسيين: مجال النهاية الأمينية والذي يتكون بشكل أساسي من الملاءة بيتا ويدعى N-terminal β-domain، ومجال النهاية الكربوكسيلية الذي يتألف من الحلزون ألفا C-terminal α-domain (الشكل 7)

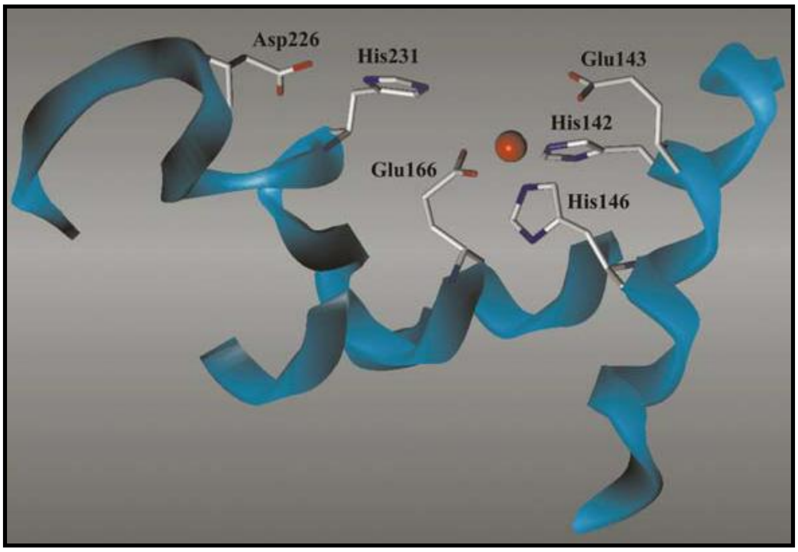


الشكل (7). البنية الفراغية ثلاثية الأبعاد لبروتين الزنك بروتياز عند الـ *E. coli*، حيث تظهر مجال النهاية الأمينية والملاءة بيتا (أزرق)، المجال المحفز (أزرق مخضر) إضافة إلى الملاءة بيتا الوسطى (أخضر) ومجال النهاية الكربوكسيلية وحلزون ألفا (وردي) (Ito *et al*., 2006).

3.1.2.3.1. الموقع الفعال: Active Site

أظهرت البنية الفراغية للأنزيم توضع أيون الزنك المُحفِز في منتصف الموقع الفعال والذي يقع بين المجالين الأميني والكربوكسيلي، يتألف هذا الموقع من تسلسل لثمالات الحموض الأمينية HExxH والذي يمتد ليصل إلى منتصف الحلزون α، ترتبط جزيئة الزنك مع حلقتي الأميدازول في ثمالتي الهيستيدين **H**، إضافةً إلى ارتباطها مع الزمرة الكربوكسيلية لحمض الغلوتاميك **E**، كما يؤدي ارتباطها مع جزيئة الماء الذي يلعب دور نكليوفيل إلى تشكل الشكل الرباعي Tetrahedral الحاوي على أيون الزنك في المركز.

توجد في الموقع الفعال أيضاً ثمالة غلوتامات E أخرى تقوم بدور أساس محفِز مانح للبروتون أثناء حدوث التفاعل إضافةً إلى زيادة قطبية جزيئة الماء المرتبطة بالزنك من أجل الهجوم النكليوفيلي على الرابطة الببتيدية المتفككة في الركيزة، في حين ترمز X لأي حمض أميني (Pelmenschikov *et al*., 2002; Stocker and Bode, 1995) (الشكل 8).



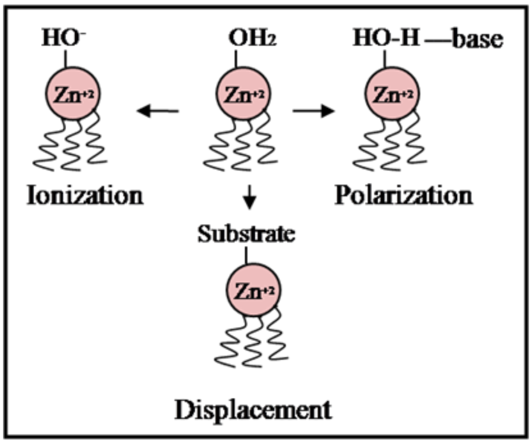
الشكل (8). الموقع الفعال لأنزيم الـ Thermolysin عند *Bacillus thermoproteolyticus* (Polaina and MacCabe, 2007).

4.1.2.3.1. آلية عمل الزنك بروتياز:

يشابه هذا النوع من الأنزيمات من حيث آلية التفاعل أنزيم Thermolysin الذي يضم موقعه الفعال التسلسل HExxH الذي يعمل على ربط جزيئة الزنك.

- **الدور المحفز للزنك:**

عند توضع الزنك مباشرة في الموقع الفعال للأنزيم فإنه يساهم في الآلية التحفيزية، حيث يؤدي الزنك في هذه الحالة إلى تشكل جسم كروي مفتوح لذلك فإن الارتباط المتعدد للزنك من الممكن أن يضم جزيئة ماء واحدة على الأقل إضافةً إلى ثلاث أو أربع ثمالات حموض أمينية (Vallee and Auld, 1992a, 1992b)، إن ارتباط الزنك بجزيئة الماء يعد أساسياً من أجل الفاعلية التحفيزية (الشكل 9)، ففي هذه الحالة إما أن يُصبح مؤيناً Ionized لارتباطه مع الهيدروكسيل، أو أن يُصبح قطبياً Polarized بوجود أساسٍ عام، كما أنه من الممكن أن يسبب حدوث هجوم نكليوفيلي لتحفيز وإزاحة الركيزة (Vallee and Auld, 1990 and 1992b).

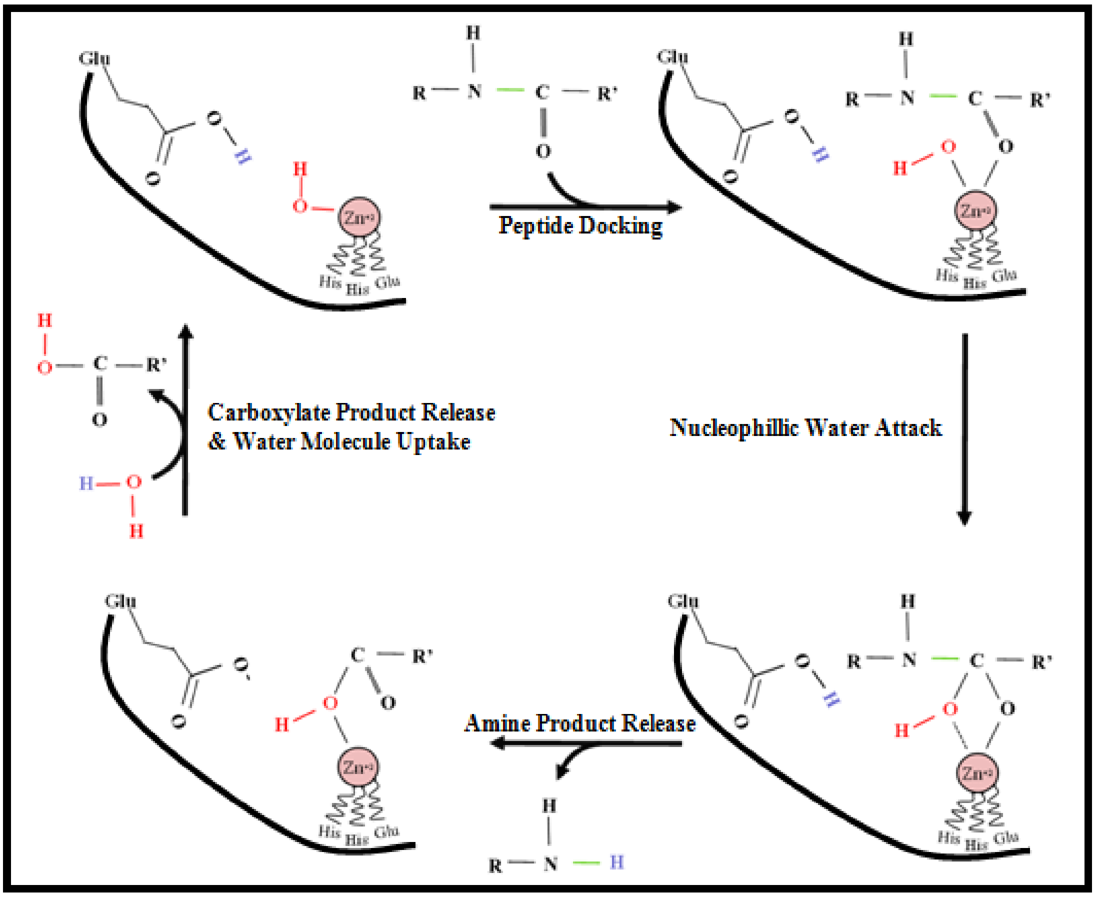


الشكل (9). الفاعلية التحفيزية للزنك عند ارتباطه بجزيئة الماء

يعمل أيون الزنك في أنزيمات الحلمهة مثل أنزيمات الزنك بروتياز كمحفز نكليوفيلي شديد، حيث تتمتع بمزيج من المميزات السابقة فهي تعمل على: ربط جزيئة ماء نشطة من أجل الهجوم النكليوفيلي، واستقطاب زمرة الكربونيل الناتجة عن الرابطة المتفككة Scissile bond، إضافةً إلى محافظتها على استقرار الشحنة السلبية للمركب الناتج في المراحل الانتقالية (Christianson and Cox, 1999).

- **الدور المحفز للأنزيم:**

يلعب أيون الزنك الدور الأساسي في آلية عمل هذا الأنزيم (الشكل 10) حيث يرتبط بثمالتي الهيستيدين وثمالة الغلوتامات المتواجدة في الموقع الفعال، يتم تفعيل جزئية الماء عند ارتباط الأوكسجين الكربوكسيلي للرابطة الببتيدية مع أيون الزنك، لتهاجم فيما بعد الكربون الكربوكسيلي للرابطة الببتيدية مؤديةً إلى تشكل الشكل الرباعي، في حين تلعب الزمرة الكربوكسيلية لثمالة غلوتامات موجودة في الموقع الفعال دور أساس محفِز يمنح البروتون (ذرة هيدروجين) المأخوذ من جزيئة الماء إلى زمرة أمين الرابطة الببتيدية مما يؤدي إلى تفكيك هذه الرابطة وتحرر الحمض الأميني (Pelmenschikov and Siegbahn, 2002).



الشكل (10). مخطط يوضح الآلية التحفيزية المتوقعة لأنزيم الزنك بروتياز.

2.2.3.1. أهم أدوار أنزيمات البروتياز المعدنية:

1.2.2.3.1. دور الزنك بروتياز في إحداث الفوعة:

تُظهر أنزيمات الزنك بروتياز المفرزة من قبل الأحياء الدقيقة الممرضة للإنسان فعالية واسعة في الإمراضية، حيث تعمل هذه الأحياء على اختراق أنسجة المضيف واستخدامه بروتيناته كمصدرٍ غذائي. تتمثل الإصابات الموضعية التي تسببها هذه الأنزيمات في حدوث تنخر أو نزف للأنسجة المتضررة وذلك نتيجة هضم العناصر البنائية الأساسية للخلية إضافةً إلى تشكيل الوذمات، في حين تعمل هذه الأنزيمات في الإصابات الجهازية كعامل فوعة داعم synergistic virulence factor من خلال تشويش حلّ العديد من البروتينات البلاسمية، إضافةً إلى أن عدم ضبط إفراز هذه الأنزيمات والسيطرة عليها يسبب تفكك الأنسجة كما يسبب العديد من الأمراض مثل التقرحات والتهاب المفاصل والتليف وأمراض القلب والأوعية الدموية (Tallant *et al*., 2010).

تبين أن لهذه الأنزيمات دوراً أساسياً في الفوعة لدى العديد من أنواع *Vibrio*، حيث تقوم بتفعيل تحت الوحدة A من الذيفان الداخلي للكوليرا *V. cholera* (Miyoshi and Shinoda, 2000)، كما تفرز أنواع أخرى أنزيماتٍ لها فاعلية في حلِّ الأنسجة المرنة Elastolytic activity (Norqvist *et al*., 1990). تبين أيضاً أن أنزيمات الزنك بروتياز المفرزة من قبل بكتريا *V. vulnificus* التي تسبب إنتاناتٍ دمويةً خطيرةً مرافقة لآفات استسقاء الجلد، تزيد من نفوذية الأوعية الدموية عن طريق تحفيزها إنتاج وسائط إلتهابية مثل الهيستامين والبراديكينين Bradykinin (Miyoshi *et al*., 1993).

تنتج الـ *Pseudomonas aeruginosa* نوعين من البروتياز المعدنية مما يمكنها من هضم العديد من بروتينات المضيف، مثل: العناصر البنائية للقرنية أو الغشاء القاعدي، إضافةً إلى البروتينات البلاسمية المساهمة في التخثر أو تفاعل المتممة (Wretlind and Pavlovskis, 1983).

أظهرت العديد من الدراسات امتلاك بعض الذيفانات المفرزة من قبل البكتريا فاعلية الزنك بروتياز، مثل: الذيفان العصبي Neurotoxin الذي تفرزه الـ *Clostridium botulinum* (Lalli *et al*., 2003)، والذيفان الداخلي للعصيات الهشة *Bacteroides fragilis* (Moncrief *et al*., 1995)، و ذيفان الجمرة Anthrax Lethal Toxin المُفرز من قبل الـ *Bacillus anthrax* (Shoop *et al*., 2005). حيث تبين أن لهذه الأنزيمات العديد من التأثيرات المرضية. من المتوقع عموماً أن أنزيمات البروتياز البكتيرية تلعب دوراً في الإمراضية عن طريق تسهيلها لانتشار البكتريا من موقع العدوى الموضعي للوصول إلى الجهاز الدوري (Hammond and Hanna, 1998).

2.2.2.3.1. دور أنزيمات البروتياز في إحداث الموت الخلوي المبرمج:

- **الموت الخلوي المبرمج: Programmed cell death**

الموت الخلوي المبرمج Programmed Cell Death (PCD) أو ما يُدعى بالـ Apoptosis، وهو عبارة عن عملية انتحار فيزيولوجية للخلايا. وصفت هذه الظاهرة للمرة الأولى من قِبل Lockshin و Williams عام 1964 كما أثبت كلٍ من Kerr وزملائه عام 1972 و Wyllie عام 1980 أن هذا الموت الخلوي لا يمتُّ بأي صلة لأنواع الموت الأخرى للخلايا، حيث لا يُعد الـ PCD المسلك الوحيد المسؤول عن موت الخلايا. على سبيل المثال: يمكن للحيوانات أن تسلك هذا المسلك عند التخلص من الخلايا الزائدة أو المتضررة بشكلٍ فعال أثناء عمليات التطور الجنيني وتمايز الخلايا بواسطةِ برامجَ وراثيةٍ تعمل على تنخرها Necrosis والتهامها لذاتها Autophagy (Szabo, 2005; Levine and Yuan, 2005)، كما تقوم النباتات أيضاً بعملياتٍ مشابهة للحفاظ على تعداد الخلايا عندها تبدأ عملية موت للخلايا من أجل استقرارها داخلياً (Vanyushin *et al*., 2004)، هذه الأشكال الناتجة عن الموت الخلوي تختلف جذرياً عن الـ Apoptosis.

لم تلاحظ هذه الظاهرة فقط لدى حقيقيات النوى العليا متعددة الخلايا (Ameisen, 1996) وإنما لوحظت أيضاً لدى وحيدات الخلية (Welburn *et al*., 1999; Cornillon *et al*., 1994) وبدائيات النوى (Hochman, 1997; Naito *et al*., 1995). إن المحافظة على وجود هذه العملية في مختلف السلالات التطورية يدل على إمكانية نشوئها من أصلٍ مشترك (Lee *et al*., 2000).

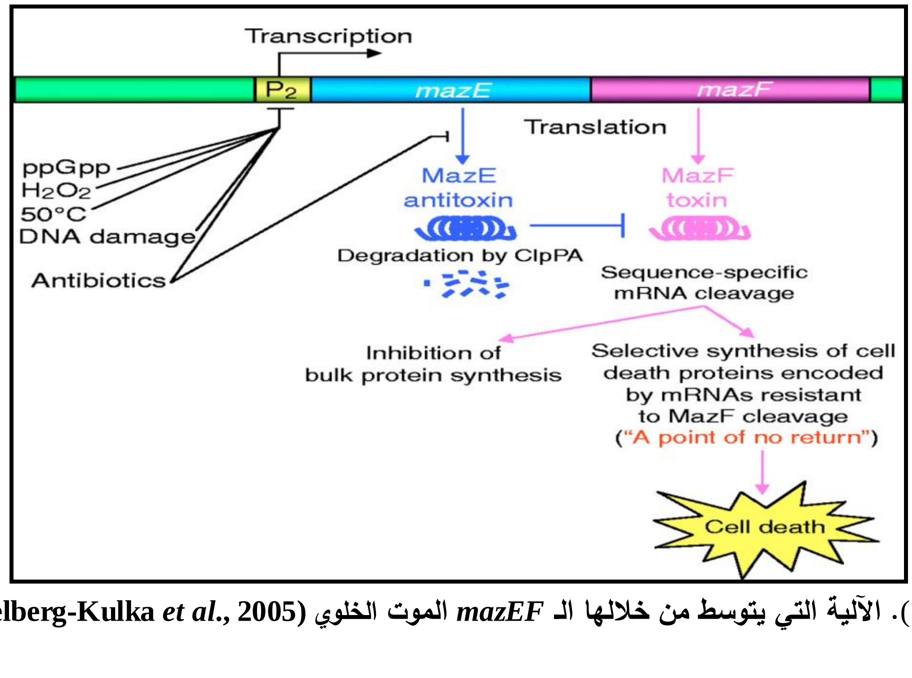
لم تعرف بعد آلية تفعيل الموت الخلوي المبرمج تماماً، إلا أنه لوحظ في العديد من نماذج الـ Apoptosis أن خطوة الحلّ البروتيني ضرورية من أجل شطر الدنا بواسطة أنزيمات القطع الداخلية endonucleases (Squier *et al*., 1994; Bruno *et al*., 1992). لذلك فمن المتوقع أن تلعب أنزيمات البروتياز دوراً أساسياً في بدء عملية الموت الخلوي المبرمج، حيث إنه من الممكن أن تُحفَز هذه العملية عن طريق بروتياز خارجي المنشأ Exogenous protease يدخل ضمن الخلايا، كما أنه من الممكن أيضاً أن تتم بواسطة بروتياز داخل خلوي Intracellular protease بواسطة العديد من المحفزات. يسبب تفعيل البروتياز تفكيك معظم البروتينات الخلوية والذي ينتج عنه الموت الكيميائي الحيوي إضافةً إلى حدوث تغيرات مورفولوجية للخلية (Lee *et al*., 2000).

إن دراسة البرامج الوراثية المحفزة للموت الخلوي عند البكتريا مازالت محدودة، حتى الآن تمت دراسة برنامجين موجودين لدى الـ *E. coli* و *Bacillus subtilis*.

أحد أهم الدراسات التي تدور حول موت البكتريا عند الـ *E. coli* تتم من خلال مركبات وراثية محددة تدعى بمركبات الإدمان "Addiction modules" أو أنظمة Toxin–antitoxin systems، والتي تتألف من زوج من المورثات المختصة بمكونين، الأول عبارة عن ذيفان ثابت Stable toxin والثاني مضاد للذيفان غير ثابت Unstable antitoxin يتدخل ليبطل الفعل السام للذيفان. تمتلك الـ *E. coli* عدداً من المورثات التي تعمل كأزواج أثناء عملية الـ PCD (Christensen *et al.*, 2004; Hayes, 2003)، إلا أن الزوج الأكثر دراسةً هو *mazEF* (Engelberg-Kulka *et al.*, 2005).

- **نظام الـ *mazEF*:**

يتألف هذا النظام من مورثتين متجاورتين هما، *mazE* و *mazF* واللتين ترمزان لمضاد الذيفان (ترياق) المتغير MazE والذيفان الثابت MazF، فقد تبين أن مضاد الذيفان يتفكك في الكائن الحي بواسطة السيرين بروتياز CIp serine protease (Aizenman *et al.*, 1996)، حيث وُجِد أن التعبير عن *mazEF* يتم من خلال التنظيم الذاتي الراجع Negatively autoregulated على مستوى عملية النسخ، عن طريق ارتباط عمل بروتينات الـ MazE مع الـ MazF في محضض الـ *mazEF* (P_2) (Marianovsky *et al.*, 2001) (الشكل 11).



الشكل (11). الآلية التي يتوسط من خلالها الـ *mazEF* الموت الخلوي (Engelberg-Kulka *et al.*, 2005).

خلافاً لأنظمة Toxin–antitoxin systems الناتجة عن وجود الصبغيات الإضافية والتي يتم تحريضها عند فقدان الخلية البكتيرية للبلاسميد، يتم تفعيل هذا النظام عن طريق عددٍ من الإجهادات التي تعيق التعبير عن الـ *mazEF*، وبالتالي يتوقف اصطناع الـ MazE مما يُحفز الـ PCD، من هذه الإجهادات:

1. عجز شديد في الحموض الأمينية مما يؤدي إلى إنتاج جزيئات إشارية تدعى بالـ guanosine pentaphosphate (ppGpp) والتي تعمل على تثبيط اصطناع الـ RNA (Engelberg-Kulka *et al*., 1998).
2. وجود بعض المضادات الحيوية المثبطة لعمليات النسخ والترجمة، مثل: Rifampicin و Chloramphenicol (Sat *et al*., 2001) إضافةً إلى وجود بعض أنزيمات البروتياز.
3. إجهادات الأكسدة (H_2O_2) (Hazan *et al*., 2004).
4. حدوث أضرار جسيمة للدنا مما يقلل من انتساخ الـ *mazEF*، فيتحفز برنامج الموت الخلوي (Sat *et al*., 2003).

إن وجود مثل هذه المركبات في صبغيات العديد من الأنواع البكتيرية يوحي بأهمية الدور الذي يلعبه الموت الخلوي المبرمج في تطور وفيزيولوجيا البكتريا (Engelberg-Kulka *et al*., 2005).

3.2.2.3.1. التطبيقات الصناعية لأنزيمات البروتياز المعدنية:

تعتبر أنزيمات البروتياز من أكثر الأنزيمات أهمية في الصناعة، نظراً لاستخدامها بشكلٍ مكثفٍ في العديد من الصناعات منها التصنيع الغذائي، حيث تستخدم في تطرية اللحوم وإزالة الطعم المر من بعض الأغذية وصناعة الأجبان، وصناعة المنظفات ومعالجة المخلفات (Karbalaei-Heidari *et al*., 2009)، إضافةً إلى الصناعات الصيدلانية حيث تحضر بعض المراهم الطبية وغسول الشعر والجلد وعلاج بعض المشاكل المتعلقة بتخثر الدم (Vellard, 2003; Gupta *et al*., 2002) وإنتاج بعض العقاقير (الجدول 4)، كما تُستخدم أنزيمات البروتياز المعدنية في الصناعات التخمرية Brewing industry، مثل: تحسين ترشيح البيرة وتخفيض محتواها من السعرات الحرارية، صناعة الجلود إضافةً إلى معالجة مخلفات الذبائح، وتحسين خصائص الخبز والدقيق (Polaina and MacCabe, 2007).

تساهم أنزيمات البروتياز عموماً في الإستفادة من مخلفات المسالخ والمواد البروتينية الرخيصة للحصول على نواتج تحلل بروتينية ذات قيمة غذائية عالية يمكن إضافتها إلى أعلاف الحيوانات أو البروتينات الأخرى لتحسين خواصها الوظيفية (Polaina and MacCabe, 2007).

الجدول (4). يمثل الببتيداز المستخدمة في تصنيع العقاقير تجاه مرض معين وأدوارها الحيوية (Mittl and Grutter, 2006).

Peptidase used in structure-based drug design الببتيداز المستخدمة في تصنيع العقاقير

الببتيداز **Peptidase**	الدور الحيوي **Biological function**	المرض **Disease**
Cysteine peptidase		
Cathepsin B	Antigen processing	Acute pancreatitis, cancer
Cathepsin L and S	Lysosomal proteolysis	Inflammation
FP-2	Haemoglobin degradation	Malaria
Caspase-1	Maturation of interleukine 1-β	Ameliorate inflammation, endotoxic shock
Caspase-3 and -7	Executioner caspase in apoptosis	Neuronal and cardiac ischemic injuries
Calpain-1 and -2	Degradation of cytoskeletal protein	Stroke, neural injuries
Picomain cystein peptidase	Processing of viral pro-protein	Virus infection
Serine peptidase		
Thrombin	Proteolysis of fibrinogen	Thrombosis
Factor Xa	Conversion of prothrombin to thrombin	Thrombosis
Factor VIIa	Activation of factors IX and X	Thrombosis
Urokinase	Activation of plasminogen	Cancer
Flavivirus peptidase	Processing of polyprotein	Viral infection
DPP -4	Processing of hormone precursors	Type 2 diabetes mellitus
20S Proteasome	Ubiquitin-dependent protein degradation	Cancer
Aspartic peptidase		
HIV peptidase	Processing of viral pro-protein	HIV infection
Renin	Processing of angiotensinogen	Blood pressure
Memapsin-2	B-Secretase activity	Alzheimer’s disease
Plasmepsin	Haemoglobin degradation	Malaria
Metallo peptidase		
Angiotensin-converting enzyme	Conversion of angiotensin	Hypertension
Botulinium neurotoxin	Cleavage of SNAP proteins	*Clostridium* and tetanus infection
Anthrax lethal factor	Cleavage of MAPKK	*B. anthrax* infection
Matrix metallopeptidase-1	Degradation of connective tissue	Tissue damage in tumour invasion
FtsH	Elimination of misfolded proteins	Neurological diseases
Carboxypeptidase B and U	Cleavage of tissue plasminogen activator	Blood coagulation
PSMA	Liberates glutamate from Ac-Asp-Glu in brain	Marker for prostate cancer

الفصل الثاني

مواد وطرائق العمل

2. المواد والطرائق: Materials and methods

1.2. السلالات البكتيرية والبلاسميدات: *Bacterial strains and plasmids*

1.1.2. السلالات البكتيرية: *Bacterial strains*

- **البروسيلا الضأنية 16M** ***B. melitensis*** المعزولة في مخابر دائرة الميكروبيولوجيا والمناعيات التابعة لقسم التقانة الحيوية والبيولوجيا الجزيئية في هيئة الطاقة الذرية (AECS).

- **سلالات الـ *E. coli* المستخدمة في التنسيل والتعبير:** هي على التوالي بكتريا الـ DH10β التي تسمح بتنسيل المورثات المأخوذة من جينوم بدائيات وحقيقيات النوى، وبكتريا BL21 (DE3) إضافة إلى BL21(DE3) pLysS، حيث تمت هندسة السلالتين الأخيرتين لحمل المورثة المرمزة للـ T_7 RNA polymerase ضمن قطعة من الدنا في صبغي البكتريا تدعى بالـ (DE3) المأخوذة من ملتهم الجراثيم λ (λ Bacteriophage) (الجدول 5).

الجدول (5). النمط الوراثي للسلالات البكتيرية المستخدمة في التنسيل والتعبير، جميع هذه السلالات تخلو من عامل الإخصاب (F-) Fertility factor كما تحوي السلالة DH10β على المورثة المقاومة للستربتومايسين *rps*L(str^r)، في حين تحوي سلالة الـ pLysS المورثة المقاومة للكلورأمفينكول Cm^r. تضم كلتا سلالتي الـ BL21 طفرة في مورثة *omp*T لمنع إنتاج بروتياز الغشاء الخارجي، مما يقلل من حل البروتينات المُعبر عنها.

السلالات STRAINS	النمط الوراثي GENOTYPE	المصدر SOURCE
DH10β	F–, *mcr*A Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC), φ80*lac*ZΔM15, Δ*lac*X74, *deo*R, *rec*A1, *end*A1, *ara*D139, Δ(*ara*, *leu*)7697, *gal*U, *gal*K, λ–, *rps*L(str^r), *nup*G	Gibco BRL
BL21(DE3)	F–, *omp*T, *hsd*S_B(r_B-, m_B-), *dcm*, *gal*, λ(DE3)	Novagen
BL21(DE3) pLysS	F–, *omp*T, *hsd*S_B(r_B-, m_B-), *dcm*, *gal*, λ(DE3), pLysS (Cm^r)	Stratagene

2.1.2. البلاسميدات: *Plasmids*

1.2.1.2. البلاسميدات المستخدمة:

1.1.2.1.2. pET-15b (Novagen):

يـسمح هذا البلاسميد بتعبير عالي المستوى للبروتين الهدف ضمن بكتريا الـ *E. coli* BL21، حيث يتم تـحريض إنتـاجه بـواسطـة الـ Isopropyl b-D-thiogalactoside (IPTG)، ومن أهم ميزات بلاسميد الـ pET-15b (الشكل 12 A):

- وجود محضض T_7 promoter: يقوم بتنظيم التعبير عن المورثة.
- التسلسل المرمز للهيستيدين His-Tag: يساعد في تنقية البروتين المؤشب كما يُمكِّن من الكشف عن البروتين باستخدام Anti-His-HRP.
- مواقع التنسيل Multiple cloning sites (MCS): يتم إدخال الشدفة المرغوبة ضمنها اعتماداً على وجود تسلسل مميز ووحيد لأنزيمات القطع والغير موجود في باقي تسلسل البلاسميد.
- المورثة المقاومة للأمبيسيلين Ampicillin resistant gene (Amp^R)، وذلك من أجل انتقاء المستعمرات البكترية الحاوية على البلاسميد.

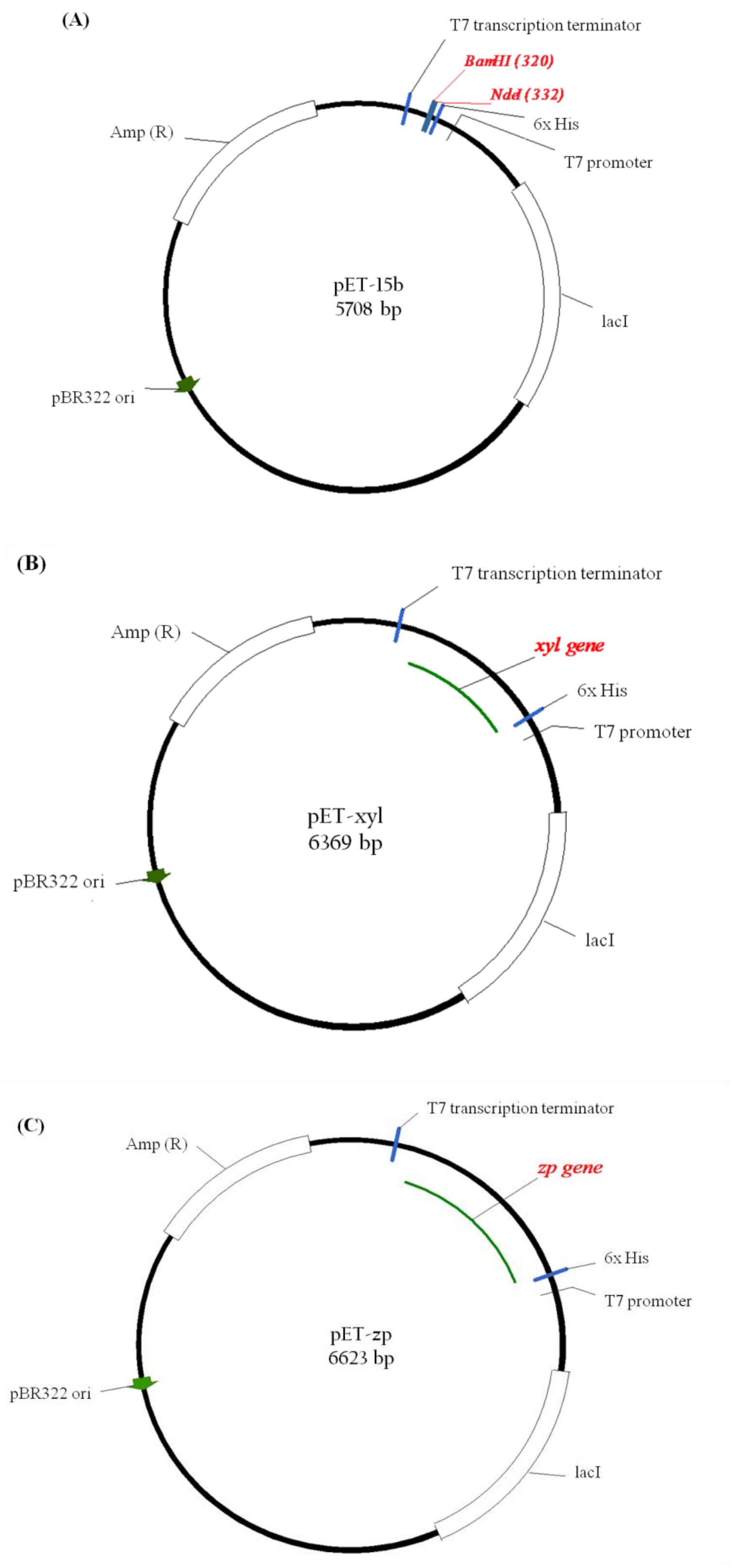
2.1.2.1.2. pET-Xyl (Al Balaa *et al*., 2006):

وهو عبارة عن بلاسميد pET-15b يحتوي على المورثـة المـرمـزة لأنزيـم الكزيليناز Xylanase، حيث تمَّ استخدامه كشاهد إيجابي أثناء عملية التعبير (الشكل 12 B).

2.2.1.2. البلاسميدات المصنعة (خلال هذا العمل):

1.2.2.1.2. pET-Zp:

وهو عبارة عن بلاسميد pET-15b يحتوي على المورثة المرمزة لأنزيم الزنك بروتياز والتـي تم عزلها والتعبير عنها خلال هذا العمل (الشكل 12 C)



الشكل (12). البلاسميدات المستخدمة والمصنعة خلال هذا العمل.

pET-15b (A) و(B) pET-Xyl و(C) pET-Zp.

2.2. أوساط الزرع والصادات: *Culture medias and antibiotics*

1.2.2. أوساط الزرع: Culture medias

1.1.2.2. أوساط زرع انتقائية لتنمية البروسيلا:

- ***Brucella* selective Agar (HIMEDIA) 1L:**

  10 g Casein enzymic hydrolysate, 10 g Peptic digest of animal tissue, 2 g Yeast extract, 1 g Dextrose, 5 g Sodium chloride, 0.100 g Sodium bisulphate and 15 g Agar, pH 7.0±0.2 at 25℃.

- ***Brucella* Broth (Acumedia) 1L:**

  10 g Enzymatic Digest of Casein, 10 g Enzymatic Digest of Animal Tissue, 2 g Yeast Extract, 1 g Dextrose, 5 g Sodium chloride, 0.100 g Sodium bisulphate, (pH 7.0±0.2 at 25℃). Finally add 5% v/v inactivated Horse serum (inactivated by heating at 56 °C for 30 mins).

2.1.2.2. أوساط زرع لتنمية الـ *E. coli*:

- **Luria-Bertani (LB) (Bio Basic INC) 1L:** 10 g Tryptone ،5 g Yeast extract and 10 g NaCl.

2.2.2. الصادات: *Antibiotics*

1.2.3.2. الأمبسلين Ampicillin (Applichem):

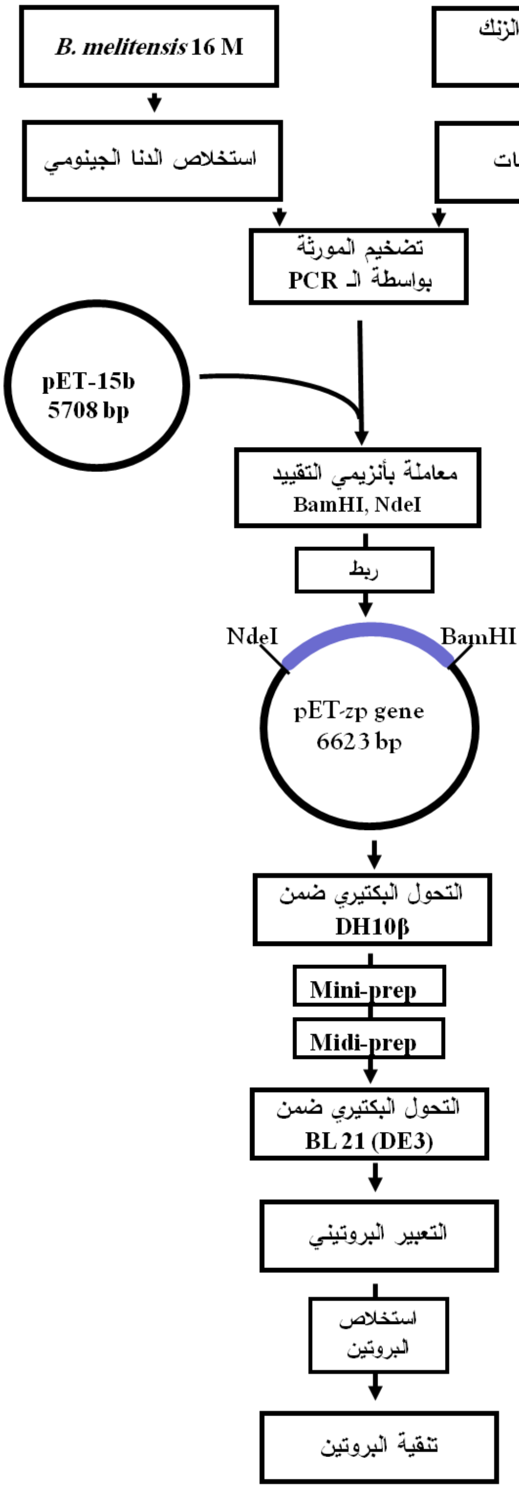
استخدم لاحتواء بلاسميد التعبير على المورثة المقاومة للأمبسلين Amp^R. يحضر بتركيز 100 mg في 1 ml من الماء المقطر، يُعقم بواسطة الفلترة ويُضاف للوسط بتركيز نهائي 100 µg/ml.

2.2.3.2. الكلورامفينيكول Chloramphenicol (BioBasic):

لاستخدام السلالة BL21(DE3) pLysS الحاوية على البلاسميد المقاوم لهذا الصاد Cm^R في عملية التعبير. يحضر بتركيز 34 mg في 1 ml من الميثانول، يُعقم بالفلترة ويُضاف للوسط بتركيز نهائي 34 µg/ml.

3.2. تقانات البيولوجيا الجزيئية: *Molecular biology techniques*

يوضح الشكل (13) ملخص مراحل العمل وتقانات البيولوجيا الجزيئية المتبعة.



الشكل (13). مخطط يوضح المراحل التي تم خلالها العمل.

1.3.2. تقانات الدنا: DNA Techniques

1.1.3.2 استخلاص الجينوم: *Genomic DNA extraction*

استخلص جينوم البروسيلا الضأنية 16M باستخدام Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega). حيث يعتمد مبدأ هذه الطريقة على أربع خطوات:

1. حلّ الخلايا وتحرر الحموض النووية.
2. إضافة RNase للتخلص من الـ RNA.
3. الترسيب الملحي للبروتينات الخلوية، حيث تترسب البروتينات في حين يبقى الدنا الجينومي ذو الكتلة الجزيئية المرتفعة في المحلول.
4. ترسيب الدنا الجينومي وإزالة الأملاح.

- **طريقة العمل:**

1. انتقاء مستعمرة مزروعة على طبق *Brucella* selective Agar واستنباتها في 5 ml من وسط *Brucella* Broth بالدرجة 37 °م لمدة ليلة كاملة.
2. تثفيل 1.5 ml من المزرعة لمدة 5 دقائق بسرعة 14500 rpm ومن ثمَّ التخلص من الطافي.
3. حلّ الراسب الخلوي جيداً بإضافة 600 µl من محلول الـ Nucleic Acid Lysis، ويحضن 5 دقائق في الدرجة 80 °م، ومن ثمَّ يُبرد حتى يصبح بدرجة حرارة الغرفة.
4. إضافة 3 µl من RNase مع المزج جيداً، الحضن لمدة ساعة بالدرجة 37 °م.
5. إضافة 200 µl من المحلول المُرسب للبروتين Protein precipitation solution حيث تُمزج العينات وتُحضن 5 دقائق بالثلج.
6. تثفيل 3 دقائق، ومن ثمَّ نقل الطافي الحاوي على الدنا بحذر لأنبوب جديد يحوي 600 µl ايزوبروبانول، ويقلب تقليباً خفيفاً، ليتم بعد ذلك ترسيب الدنا بتثفيل العينة لمدة 5 دقائق والتخلص من الطافي.
7. غسل الراسب بـ 1 ml ايتانول 70%، وتُثفل العينة الحاوية على الدنا المنقى دقيقتين إضافيتين ومن ثمَّ يُتخلص من الطافي.

8. تُجفف العينـة إمـا باستخدام جهاز speed vac (eppendrof concentrator 5301) أو بدرجـة حرارة الغرفة.

9. حلّ الراسب بـ 30 µl مـاء مقطر ومعقم وقياس تركيز الدنـا المستخلص بطول موجـة 260 nm ودرجـة نقاوته المتمثلة بنسبـة 260/280 nm والتي يجب أن تبلغ تقريباً 1.8 بواسطـة جهاز NanoDrop (Thermo) باستخدام الماء كثابت Blank.

- **المحاليل المستخدمة:**

  - Isoprobanol
  - 70% Ethanol
  - RNase (4 mg/ml)
  - Nucleic Acid Lysis (Promega)
  - Protein precipitation solution (Promega)

2.1.3.2 التفاعل السلسلي للبوليميراز: *Polymerase chain reaction (PCR)*

1.2.1.3.2. المرئسات: Primers

تم تصميم زوج من المرئسات بالاعتماد على تسلسل المورثة المأخوذ من البنك الجينومي للبروسيلا الضأنية (GenBank NO.AE008917.1) وذلك باستخدام برنامج Primer 5 (الشكل 14)، حيث أضيف إليها تسلسل أنزيمات التقييد المستخدمة والتي تتناسب مع إدخال الشدفة المضخمة ضمن بلاسميد التعبير البروتيني لاحقاً (الجدول 6).

```
001 ATGCGCTGGCAAGGCCGTAGGCAAAGCGACAATGTTGAAGATCTGCGCGG
051 TGAGCAGGGTGGTGTGGTTGGCGGCGGCTTCGGCCGCGGGGGTGGTTTCG
101 GCGGCCCCGGCTTCAGGATCGTGCGCGGCGGTGGAATTTCCGGCATTCTC
151 ATTCTCGTCGTCATGTTCTTCGTGTTGCGCGCGGTTGGCATCGATCCGAT
201 GCCCATCCTCTTTGGCGACGGCAGCATGAGCCCGACCGTGCAGACGCAAG
251 GCACGGGCCGCACGGTGGCTGAAGGCGGCACTGTCGCCAATGACGAGACG
301 ACGCAGTTCGCCCGCACCGTTCTGGCCGAGACAGAAGATGTCTGGAGCGG
351 TATTTTCCAGTCGCGCGGCCAGACCTATACGCCGCCGACGATGGTGCTGT
401 TTTCCGATCAGGTCCGTTCGGCCTGCGGCTATGCTTCGGCTGCTTCCGGT
451 CCGTTCTACTGTCCCGGCGACCGTAAGCTTTATATCGACCTCAGCTTCTA
501 CAAGGAGCTTGCCAATCGCTTTGGCGCTTCGGGCGATTTCGCGCAGGCCT
551 ATGTTCTGGCGCATGAAGTGGGCCACCATGTCCAGAATCTTCTGGGCATC
601 CTGCCGAAATTCAACCAGATGCGCCAGCAGATGAGCGAGGCGCAGGCCAA
651 CCAGACGTCGGTGCGCGTCGAGCTTCAGGCCGATTGCCTTGCGGGCGTAT
701 GGGGCCACTACACAGACCAGAAGGGCATTCTGGAAGCGGGCGACCTTGAG
751 GAAGCCTTGAACGCGGCGCATCAGATCGGTGATGACACATTACAGCGTCG
801 CAGCCAGGGCTATGTCGTACCGGAAAGCTTCAACCATGGCACCTCCGCGC
851 AACGCGCCAAGTGGTTCCAGCGTGGGTTCGATAGCGGTCAGCTTGGATCG
901 TGTGACACGTTCAGCGGCGATGTTTAG
```

الشكل (14). صورة توضح تسلسل مورثة الزنك بروتياز والتي يبلغ طولها 927 bp.

الجدول (6).المرئسات النوعية لمورثة الزنك بروتياز بعد إضافة تسلسل أنزيمات التقييد إليها.

اسم المرئسة **Primer Name**	تسلسل المرئسة **Primer Sequence (5'-3')**	عدد النكليوتيدات **No. Of Nucleotides**
F 5’ (**NdeI**)	5’- ATATAT**CATATG**CGCTGGCAAGGCCGT- 3’	**27**
R 3’(**BamHI**)	5’- ATATAT**GGATCC**CTAAACATCGCCGCTG- 3’	**28**

2.2.1.3.2. تضخيم المورثة: Gene Amplification

تعتبر طريقة الـ PCR إحدى أكثر التقنيات المكتشفة في البيولوجيا الجزيئية استخداماً وفاعلية حالياً، وذلك لجمعها ميزاتٍ فريدة تجعلها ذات حساسية ونوعية عاليتين. تمَّ استخدام جينوم البروسيلا الضأنية المستخلص كقالب عند إجراء تفاعل الـ PCR، حيثُ عُزلت مورثة الـ *zp* بواسطة هذه التقنية باستخدام مرئسات نوعية. استعمل HotStar HiFidelity Polymerase Kit (Qiagen) في التفاعل، والذي يعمل على تصحيح الأخطاء أثناء التفاعل وبالتالي ضمان خلو التسلسل الناتج من الطفرات أثناء عملية التضخيم.

- **<u>طريقة العمل:</u>**

1. إضافة 5 µl من محلول الـ HotStar HiFidelity PCR Buffer 5X والذي يحتوي على 1.5 mM $MgSO_4$ ونكليوتيدات ثنائية منقوصة الأوكسجين 0.3 mM dNTPs.
2. إضافة 5 µl من محلول Q-Solution 5X كمحسن للتفاعل.
3. أُدخل 1 µl من الدنا بتركيز نهائي (300 ng) و 1 µl من كل مرئسة بتركيز (25 p.mol/µl).
4. يُتَمم حجم التفاعل بالماء المقطر والمعقم إلى 25 µl بعد إضافة 0.5 µl من أنزيم الـ HotStar HiFidelity DNA Polymerase (2.5 units/µl).
5. تُثقل جميع المكونات لعدة ثواني لضمان تجانسها وتُوضع في جهاز الـ PCR بعد ضبطه على البرنامج المبين في الجدول (7)، ثم يُرحل ناتج التضخيم على هلامة آغاروز بتركيز 1.5%.

الجدول (7). الشروط التي يخضع لها تفاعل الـ PCR.

	المراحل **Stages**	درجة الحرارة **Temperature**	زمن الدورة **Time**
	التمسخ الأولي **Initial denaturation**	95°C	5 mins
35 cycles	التمسخ **Denaturation**	95°C	1 min
	الالتحام **Annealing**	63°C	1 min
	الإستطالة **Extension**	72°C	1 min
	الإستطالة النهائية **Final Extension**	72°C	10 mins

- **المحاليل المستخدمة:**

  - Primers
  - *Brucella* genome
  - Q-Solution 5X (Qiagen)
  - HotStar HiFidelity DNA Polymerase (Qiagen)
  - HotStar HiFidelity PCR Buffer 5X (Qiagen)

3.2.1.3.2. الرحلان الكهربائي للدنا :Agarose electrophoresis gel

- **طريقة العمل:**

1. وزن 1.5 g من الآغاروز وإتمام الحجم إلى 100 ml بإضافة بفر TAE 1X.
2. تسخين المزيج حتى الغليان مع مراعاة التحريك خلال هذه المدة. يُبرد المزيج حتى الدرجة 55 °م تقريباً ويُصب في قالب الرحلان.
3. إضافة قطرتين من بروميد الايثيديوم (EtBr (1 mg/ml إلى قالب الرحلان ويُمزج جيداً مع هلامة الآغاروز (سماكتها تقريباً 4.0-5.0 mm)، ثم يُوضع المشط الحاوي على آبار الرحلان وتُترك الهلامة حتى تتصلب.
4. إزالة المشط بحذر، ثم توضع الهلامة في حوض الترحيل، مع التأكد من وضع الهلامة في الجهة الصحيحة لجهاز الرحلان.
5. غمر الهلامة تماماً بمحلول الـ TAE 1X.

  - **تحضير العينات وترحيلها:**

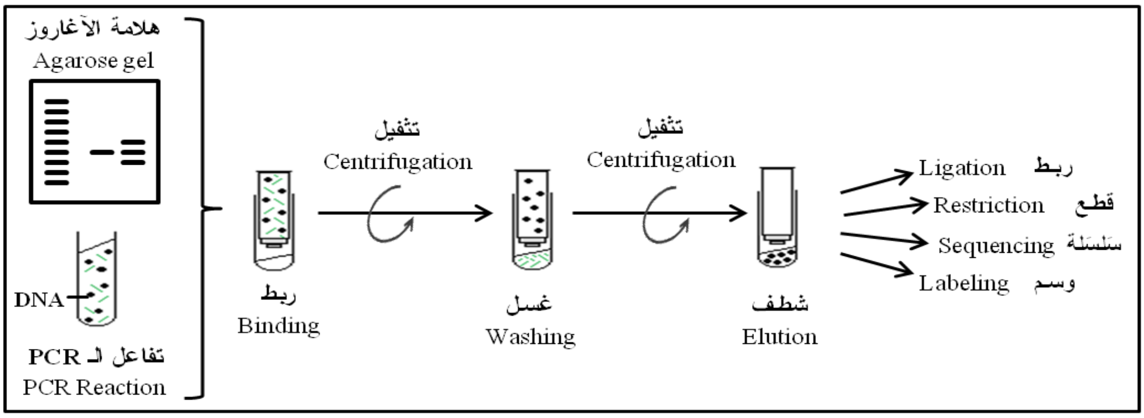
يتم إضافة 2 µl من صبغة الترحيل Loading Buffer 6X لكل 10 µl من الدنا، وتوضع داخل البئر بعد مزجها جيداً، ترحل الهلامة نحو نصف ساعة على فولتية تتراوح بين 85-100 V. ومن ثمَّ تُظهر عصائب الدنا بواسطة الأشعة فوق البنفسجية باستخدام جهاز (Uvitec).

- **المحاليل المستخدمة:**

  - **DNA marker** (Taka DNA Ladder)
  - **Ethidium Bromide** (10 mg/ml)
  - **1.5 g Agarose** in 100 ml TAE Buffer
  - **TAE Buffer 1X**: 40 mM Tris base, 5 mM sodium acetate and) 1 mM EDTA (pH 8.0)
  - **Loading Buffer 6X:** 10 mg Bromophenol blue, 10 mg Xylene cyanol FF, 10 mg Orange G, 6 ml Glycerol and 3.3 ml Tris (150 mM, pH 7.6)

4.2.1.3.2. تنقية الدنا: DNA purification

تمت تنقية مورثة الـ *zp* باستخدام Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) والذي صمم لاستخلاص وتنقية شدف الدنا التي يتراوح طولها بين 100 bp-10 kb. يتم ذلك إما بتنقية ناتج تفاعل التضخيم مباشرةً أو بقص الشدفة من هلامة الآغاروز وذلك للتخلص من النكليوتيدات والمرئسات المتبقية (الشكل 15). يعتمد مبدأ هذه التنقية على مقدرة الدنا على الارتباط بغشاء السيليكا Silica membranes بوجود أملاح Chaotropic salts التي تعمل على استقرار القوى الداخلية الجزيئية مثل الروابط الهيدروجينية كما تزيد من انحلالية البروتينات الكارهة للماء.



الشكل (15). مخطط تنقية شدفة الدنا اعتباراً من ناتج التضخيم أو من هلامة الآغاروز.

- **طريقة العمل:**

1. مزج حجم من الدنا مع حجم من محلول الارتباط Membrane Binding buffer، ثم يُنقل المزيج الناتج إلى الفلتر.
2. حضن في درجة حرارة الغرفة لمدة دقيقة واحدة. ومن ثم تثفيلها بسرعة 14500 rpm لمدة دقيقة. والتخلص من الراشح، في هذه الخطوة يرتبط الدنا بغشاء السيليكا أثناء مرور الراشح.
3. غسل الفلتر بإضافة 700 µl من الـ Membrane wash solution والتثفيل بسرعة 14500 rpm لمدة دقيقة.
4. إعادة غسل الفلتر بإضافة 500 µl من الـ Membrane wash solution والتثفيل بسرعة 14500 rpm لمدة 5 دقائق.
5. تثفيل أخير دون إضافة شيء، للتأكد من زوال جميع آثار المحلول السابق.

6. يُنقل الفلتر إلى إبندروف جديد ويضاف له محلول Elution buffer في مركز الفلتر تماماً، ويُحضن في درجة حرارة الغرفة لمدة دقيقة.

7. تثقيل بسرعة 14500 rpm لمدة دقيقة. ثمَّ يُقاس تركيز العينة بجهاز (NanoDrop).

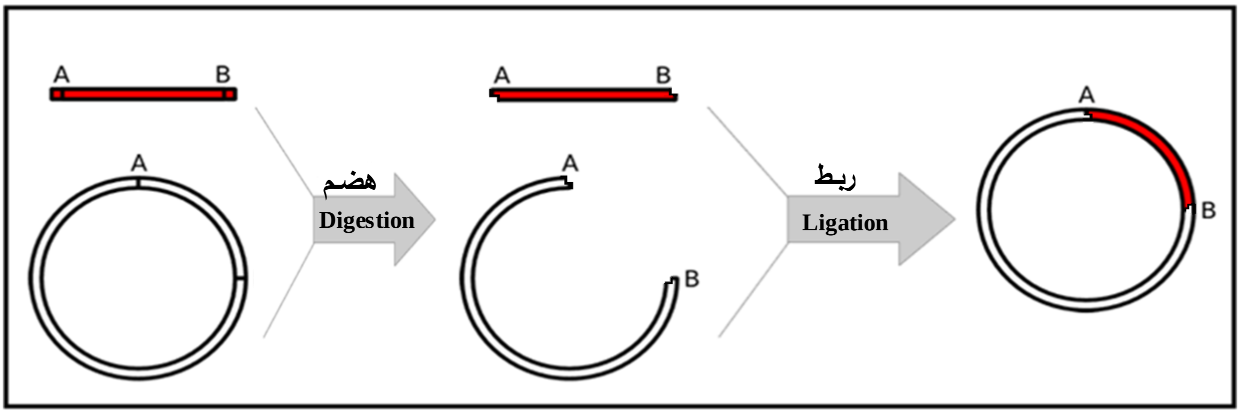
- **المحاليل المستخدمة:**

  - **Membrane binding buffer:** 4.5 M guanidine isothiocyanate and 0.5 M potassium acetate (pH 5.0)
  - **Membrane washing solution**: 10 mM potassium acetate (pH 5.0), 80% ethanol and 16.7µM EDTA (pH 8.0)
  - **Elution buffer**: H_2O

3.1.3.2 تنسيل مورثة الزنك بروتياز: *Cloning of zp gene*

1.3.1.3.2. أنزيمات التقييد والربط: Restriction and ligation enzymes

بعد الحصول على المورثة بشكل نقي يتم معاملتها بأنزيمي التقييد الـ NdeI والـ BamHI (Fermentas) ومن ثم ربطها مع بلاسميد الـ pET-15b المعامل بنفس الأنزيمات حيث يبلغ حجم القطعة المزالة من البلاسميد 13 شفع آزوتي. وذلك لضمان وجود توافق في النهايات اللزجة الناتجة مما يُمكنها من الارتباط سويةً باستخدام أنزيم الربط T_4 DNA ligase (Fermentas)، والذي يعمل على تنشيط تشكل الروابط الفوسفورية ثنائية الاستر بين فوسفات 5’ للنكليوتيدات الحرة وهيدروكسيل النهاية 3’، يتطلب تشكل هذه الرابطة استخدام جزيئات الـ ATP كمصدر للطاقة و Mg^{+2} كعامل مساعد (الشكل 16).



الشكل (16). صورة توضيحية لآلية معاملة الشدفة المرغوبة والبلاسميد بأنزيمات التقييد وربطهما سوياً بأنزيم الربط.

- أنزيمات التقييد: Restriction enzymes

- **طريقة العمل:**

1. تمزج المواد اللازمة وفقاً للجدول (8).
2. وضع المزيج في حمام مائي درجة حرارته 37 °م لمدة لا تقل عن ساعتين.
3. ترحيل 5 µl من المزيج بإضافة 1 µl من محلول الـ Loading Buffer 6X على هلامة الأغاروز 1.5% للتأكد من نجاح عملية القطع.
4. تثبيط عمل الأنزيم لمدة 20 دقيقة حسب درجة الحرارة المرفقة مع كل أنزيم، وهي 80 °م لأنزيم BamHI و 65 °م لأنزيم NdeI.
5. ترحيل كامل العينة وقصها مباشرةً من الهلامة على طول موجة 365 nm.
6. تنقية العينة باستخدام PCR cleanup system kit (Promega) عن طريق تحديد وزن الشدفة المقطوعة وإضافة حجم مماثل من Binding buffer ومن ثم حضنها في حمام مائي درجة حرارته 55 °م حتى ذوبان الهلامة، ثمَّ تُطبق كافة الخطوات المذكورة سابقاً أثناء تنقية ناتج التضخيم.
7. قياس تركيز العينات لتحديد التركيز المناسب المدُخل في تفاعل الربط (الجدول 9).

الجدول (8). مكونات تفاعل القطع من أجل قطع 1 µg من الدنا.

المكونات Components	الحجم النهائي Final Volume 10 µl
Tango buffer 10x	2 µl
NdeI (10 u/ µl)	1 µl
BamHI (10 u/ µl)	1 µl
DNA (1 µg/ µl)	1 µl
d.dH_2O	5 µl

- أنزيم الربط: **Ligation enzyme**

يعتمد تفاعل الربط بشكل أساسي على نسبة الشدفة إلى البلاسميد، حيث يُفضل زيادة تركيز الشدفة بالنسبة للبلاسميد لرفع احتمالية الربط، يحسب تركيز الدنا الداخل بالتفاعل عن طريق المعادلة التالية:

$$\text{تركيز الشدفة}(ng) = \frac{\text{طول الشدفة}\ (bp)\ \mathbf{X}\ \text{تركيز البلاسميد}\ (ng)}{\text{طول البلاسميد}\ (bp)}\ \mathbf{X}\ \text{نسبة}\ \frac{\text{شدفة}}{\text{بلاسميد مقطوع}}$$

$$\text{تركيز الشدفة}(ng) = \frac{(50\ ng)\ \mathbf{X}\ (927\ bp)}{(5708\ bp)}\ \mathbf{X}\ 10 = 81.2$$

الجدول (9). مكونات تفاعل الربط.

المكونـات **Components**	الحجم النهـائي **Final Volume 10 µl**
DNA (zinc protese) 81.2 ng	4.5 µl
DNA (plasmid) 50 ng	2.0 µl
Ligase buffer 10X	1.0 µl
T_4 ligase (1 U/µl)	2.0 µl
$d.dH_2O$	0.5 µl

تحضن جميع المكونات السابقة ليلة كاملة في حمام مائي درجة حرارته 16 °م.

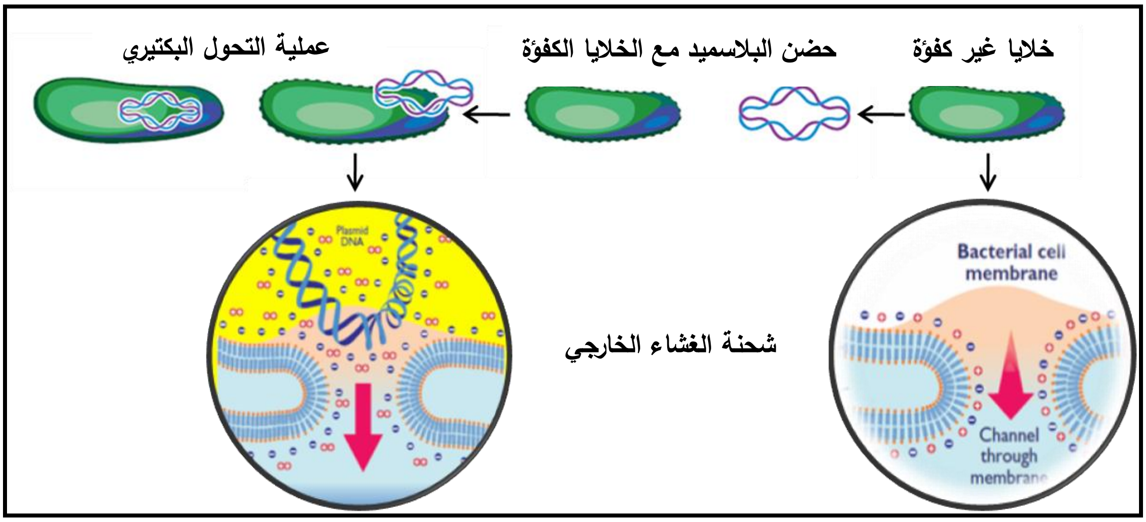
- **المحاليل المستخدمة:**

- Tango Buffer 10X: 10 mM Mg-acetate, 66 mM K-acetate, 0.1 mg/ml BSA and 33 mM Tris-acetate (pH 7.5 at 37°C)
- T4 DNA Ligase Buffer 10X: 400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl2, 100 mM DTT and 5 mM ATP (pH 7.8 at 25°C)

.2.3.1.3.2 التحول البكتيري: Bacterial Transformation

يعتمـد دخـول المـادة الوراثيـة لـداخل الخلايـا البكتيريـة علـى ثلاثـة طـرق: الاقتـران Conjugation والتنبـيـغ Transduction والتحـول Transformation. حيـث تـتم تلـك الأخيرة بطـريقتين إمـا عـن طريـق الصـدمة الكهربائيـة Electroporation أو بالصـدمة الـحرارية Heat shock والـتي تُدعـى أيضـاً بـالتحول الكيميـائي Chemical transformation (Topcu, 2000). تبـدأ عمليـة التحـول الكيميائي بجعـل الخلايـا البكتيرية كفؤة Competent، أي تُصبح قادرةً على إدخال المادة الوراثية ضمنها.

تمّ تـحـضـيـر ثـلاثـة أنــواع مــن الــخـلايا الـكـفـؤة، وهـي الـ DH10β للـتـنـسـيـل والـ BL21(DE3) والـ BL21(DE3) plysS للتعبيـر، حيـث تـنـتمي هـذه الأنــواع لـجنس الـ *E. coli*، عُـوملـت هـذه الـخـلايـا بـمـزيج من محلول 60 mM $CaCl_2$/glycerol 15% البارد والذي يُغلِّف أسطح الخلايا بشحنة موجبة ممكناً بذلك الدنا ذو الشحنة السالبة من الارتباط على أسطح الخلايا الكفؤة، ليتم فيما بعد إدخاله لداخل الخلايا بتعريضها للصدمة الحرارية (الشكل 17).



الشكل (17). صورة لآلية التحول البكتيري للبلاسميد ضمن الخلايا ذات الكفاءة.

- تحضير الخلايا الكفوءة كيميائياً: **Chemically Competent Cells Preparation**

- **طريقة العمل:**

1. زرع 10 µl من مزرعة البكتريا المرغوبة المحفوظة بالدرجة ¯ 80 °م على طبق LB Agar، وحضن الطبق بالدرجة 37 °م من 12–16 ساعة.

2. انتقاء مستعمرة مفردة وتنميتها في 10 ml من وسط LB Broth، بالدرجة 37 °م ليلة كاملة.

3. إضافة 2 ml من المزرعة النامية إلى 200 ml من وسط LB Broth.

4. حضن بالدرجة 37 °م حتى تصل قيمة الكثافة الضوئية Optic Density (OD_{600}) إلى 0.3-0.4 والتي تستغرق تقريباً 2–3 ساعات.

5. توزيع المزرعة على أنابيب 50 ml، وحضنها بالثلج 10 دقائق ومن ثمَّ تثفل لمدة 10 دقائق بالدرجة 4 °م بسرعة 3000 rpm.

6. حل الراسب جيداً بـ 40 ml من محلول 60 mM $CaCl_2$/15% glycerol البارد، ومن ثمَّ يثفل ثانيةً لمدة 5 دقائق بالدرجة 4 °م بسرعة 2500 rpm، مع التخلص من الطافي بحذر.

7. حل الراسب جيداً بـ 40 ml من محلول 60 mM $CaCl_2$/15% glycerol البارد، ويُحضن بالثلج لمدة 30 دقيقة.

8. تثفيل لمدة 5 دقائق بالدرجة 4 °م، 2500 rpm، مع التخلص من الطافي بحذر.

9. يعلق الراسب جيداً بـ 8 ml من محلول 60 mM $CaCl_2$/15% glycerol البارد.

10. يوزع 200 µl من المعلق على أنابيب إبندروف باردة، وتحفظ بالدرجة ¯ 80 °م.

ملاحظة: أثناء العمل يجب معاملة هذه الخلايا برفقٍ وحذرٍ شديدين، كما يجب اختبار كفاءة هذه الخلايا وعقامتها بزراعتهاعلى أطباق LB-Agar و LB حاوية على الصاد الحيوي المناسب.

- **المحاليل المستخدمة:**

  - LB plates (1.5 g Agar/100 ml medium)
  - 60 mM $CaCl_2$/15%glycerol, autoclave/cold fresh use

- التحول الكيميائي: **Chemical Transformation**

- **طريقة العمل:**

1. وضع الخلايا الكفوؤة مباشرةً بالثلج بعد استخراجها من ⁻ 80 °م، ثم إضافة 10 µl من المحلول الناتج عن تفاعل الربط Ligation product (أو DNA بتركيز 50 ng على الأقل) إلى 50 µl من الخلايا المهيأة ضمن أنبوب إبندروف مبرد. يجب الانتباه إلى أن لا يتجاوز حجم تفاعل الربط 10% من حجم الخلايا المهيأة.
2. حضن في الثلج نصف ساعة يرتبط خلالها الدنا السالب بأسطح الخلايا الموجبة.
3. نقل الأنبوب إلى حمام مائي درجة حرارته 42 °م، لمدة 45 ثانية تماماً، حيث تحدث صدمة حرارية تدخل على إثرها البلاسميدات لداخل الخلايا.
4. حضن لمدة دقيقتين في الثلج.
5. إضافة 500 µl من وسط LB Broth الدافئ، ثم تحضن في الدرجة 37 °م لمدة ساعة مع الرجّ بسرعة 225-250 rpm.
6. تفرش الخلايا جيداً على أطباق LB-Amp (يفضل أن تكون دافئة) لانتقاء المستعمرات البكتيرية الحاوية على البلاسميد.
7. حضن بالدرجة 37 °م لمدة تتراوح بين 12–16 ساعة.

ملاحظة: الشواهد المستخدمة في هذه الطريقة عبارة عن بلاسميد مقطوع يُمثل الشاهد السلبي وبلاسميد مغلق يمثل الشاهد الإيجابي. تُزرع بكتريا الـ *E. coli* BL21 بعد إدخال البلاسميد المرغوب فيها على أطباق LB Agar حاوية على الصاد المناسب، تحضن الأطباق بالدرجة 37 °م لمدة تتراوح بين 16-24 ساعة.

4.1.3.2 استخلاص البلاسميد: *Plasmid Extraction*

تعتبر طريقة استخلاص البلاسميد من الـ *E.coli* من أكثر الطرق شيوعاً في البيولوجيا الجزيئية والتي تدعى أيضاً بطريقة الحلّ القلوية Alkaline lysis، حيث يتم فيها استخلاص البلاسميد من مزيج حاوي على الصبغي البكتيري والـ RNA والبروتينات إضافةً إلى عناصر خلوية أخرى، تتألف هذه الطريقة من أربعة خطوات أساسية:

1. حلّ الخلايا:

يتم إضـافة محلول حالّ للخلايا Detergent lysis يندمج مع الليبيدات المشكلة للغشاء السيتوبلازمي للبكتريا ويقوم بتخريب بنيته، مما يؤدي إلى تخريب الجدر الخلوية للبكتريا وتشكل ثقوب في الغشاء وبدء تحلل الخلايا.

2. تمسخ الدنـا الصبغي والبروتينات وترسيبها:

فـي هذه الخطـوة يبـدأ الجـزء القلـوي بإضـافة محلـول قلـوي مثـل هيدروكسـيد الصـوديوم NaOH إلـى المزيج، حيث تحدث زيادة كبيرة للـ pH من 7 تقريباً إلى 12، هذا التباين الكبير في pH يؤدي إلى تمسخ الدنا والبروتينات وتغير بنيتها، كما يتم تفكك الـ RNA. تتميز هذه الطريقة في إمكانيـة فصـل البلاسميد عن الدنـا الصـبغي والبروتينـات عـن طريـق تخفيض الـ pH بإضـافـة محلـول ملحـي عـالي الحموضـة High-salt acidification يؤدي إلى انـفـصـال الـبلاسـميد وتـرسـيب الـبروتينـات الـخلوية والدنـا الصـبغي للبكتريـا، حيثُ إن عودة الـ pH إلـى قيمتها الأوليـة يؤدي إلـى عودة البلاسميدات إلـى طبيعتها لصـغر حجمها وبالتالي تكون إمكانيـة إعادة إلتقاء سلاسل الدنـا المتمسخة للبلاسميد أكبر من الدنـا الصـبغي. يشكل الدنا الصبغي والبروتينات بعد التثفيل راسباً أبيض اللون في حين يبقى البلاسميد المعزول منحلاً في الطافي (الشكل 18).

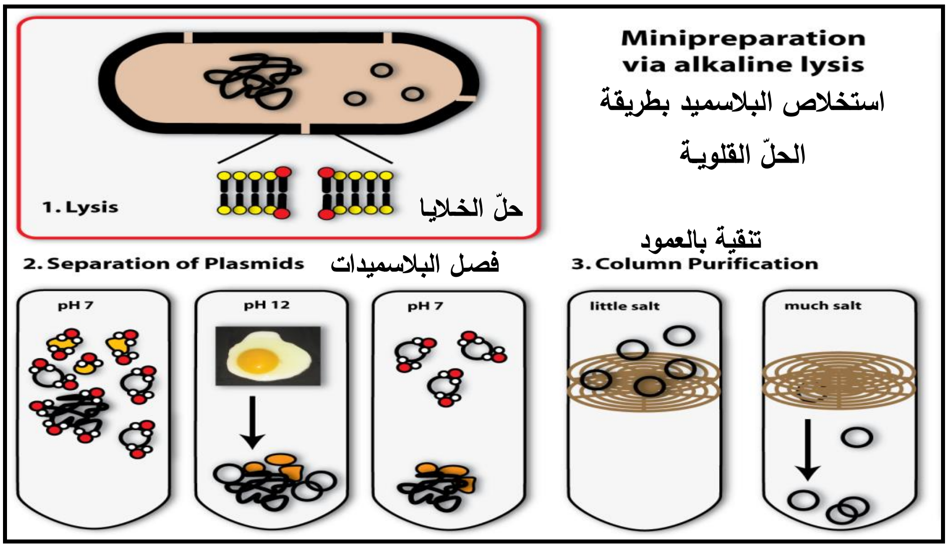
3. ربط الدنـا بالعمود أو ترسيبه:

يجـب اسـتخلاص البلاسـميد مـن المحلـول الملحـي النـاتج لاسـتخدام البلاسـميد النقـي فـي التطبيقـات المستقبلية. يتم ذلك بترسيبه بإضافة الايزوبوتانول أو باستخدام عمود السيليكا الذي يربط الدنـا الموجود ضمن المحلول الملحي، وعند التثفيل يمر المحلول الملحي عبر العمود ويبقى الدنا مرتبطاً بالغشاء.

4. حل البلاسميدات:

أخيـراً يـتم حـل الدنــا المـرتبط بـالعمود بإضــافة المـاء أو أي محلـول مـنخفض الملحيـة حيـث تتفكـك الروابط المتشكلة بين الدنا والسيليكا ليتم انحلال البلاسميد والحصول عليه بشكل نقي.

تختلف تسمية هذه الطريقة باختلاف حجم المزرعة المراد استخلاص البلاسميد منها وهي على التتالي: Mini-prep، Midi-prep، Maxi-prep، Giga-prep.



الشكل (18). صورة لاستخلاص البلاسميد من الخلايا البكتيرية، حيث يتم استخلاص البلاسميدات من بين الصبغيات البكتيرية والبروتينات وحطام الأغشية الخلوية، ومن ثم ترسيبها أو غسلها باستخدام عمود السيليكا، تُنقى البلاسميدات أخيراً باستخدام عمود التنقية بإضافة محلول ذو ملوحة منخفضة.

- **طريقة العمل:**

1. انتقاء عدد من المستعمرات الناتجة عن التحول البكتيري وتنميتها في أنابيب حاوية على 5 ml من وسط LB-Amp، وتُحضن ليلة كاملة بالدرجة 37 °م. في اليوم التالي تُنقل المزرعة إلى أنابيب 1.5 ml وتُثفل لمدة 5 دقائق بسرعة 14500 rpm، يتم بعد ذلك التخلص من الطافي والاحتفاظ بالراسب. تكرر هذه الخطوة حتى إتمام 3 ml ويُحتفظ بباقي المزرعة في 4 °م لاستخدامها في مراحل لاحقة.
2. حلّ الخلايا بإضافة 250 µl من المحلول P_1 حتى تجانس المزيج.
3. إضافة 250 µl من محلول P_2 تقليب 4−6 مرات برفق، حضن في درجة حرارة الغرفة 5 دقائق، يأخذ المحلول في هذه الخطوة قواماً مخاطياً.
4. إضافة حجم مماثل من محلول P_3 البارد ويُقلب أيضاً عدة مرات، حضن في الثلج لمدة 5 دقائق.
5. تثفيل 5 دقائق بسرعة 14500 rpm، لترسيب الحطام الخلوي والدنا الصبغي.
6. نقل الطافي إلى أنبوب جديد. ثم يُعاد التثفيل مرة أخرى للتخلص من بقايا الراسب المتشكل تماماً ويُنقل الطافي إلى أنبوب آخر.
7. إضافة ايزوبروبانول بمقدار 0.7 من حجم الطافي الناتج يُمزج جيداً، ويُثفل لمدة 10 دقائق بسرعة 14500 rpm لترسيب الدنا البلاسميدي والتخلص من الطافي.

8. غسل بـ 200 µl من الايثانول 70% البارد، تثفيل 5 دقائق والتخلص من الطافي.
9. تجفيف الراسب في درجة حرارة الغرفة أو بواسطة جهاز Speed Vacuum (eppendrof).
10. حلّ الراسب بـ 30 µl من الماء المقطر والمعقم، وقياس تركيزه على جهاز NanoDrop.

عوملت البلاسميدات الناتجة بأنزيمات القطع الملائمة (الجدول 4) للتأكد من وجود مورثة الـ *zp* بداخلها، ومن ثم استنبت المستعمرات الإيجابية الحاوية على بلاسميد الـ pET-Zp بمزرعة أكبر باستخدام Plasmid Midi kit (Qiagen) للحصول على البلاسميد بكمية أكبر وذو نقاوة عالية لادخاله في البكتريا الخاصة بالتعبير.

- **المحاليل المستخدمة:**
  - **70% EtOH**
  - **Isoprobanol**
  - **P_1 Solution:** 100 µg\ml RNase, 50 mM Tris (pH 8.0 with/ HCl), 10 mM EDTA
  - **P_2 Solution**: 200 mM NaOH, 1%SDS
  - **P_3 Solution**: 2.55 mM potassium acetate (pH 4.8 with/ glacial acetic)

5.1.3.2. سلسلة البلاسميد المؤشب: *Recombinant plasmid sequencing*

هي طريقة لتحديد التسلسل النكليوتيدي للدنا وذلك للتأكد من خلوه من الطفرات التي من الممكن أن تحدث أثناء عملية التنسيل إضافةً إلى التأكد من اندراج المورثة في مكانها الصحيح ضمن البلاسميد. تمت سلسلة بلاسميد الـ pET-Zp في مخبر الصبغيات التابع لدائرة الوراثة البشرية في قسم التقانة الحيوية والبيولوجيا الجزيئية في هيئة الطاقة الذرية، باستخدام جهاز محلل سمات الدنا (310 Genetic analyzer ABI Prism) من شركة Applied Biosystem، تم تحضير العينة وفقاً للجدول (10) قبل إرسالها إلى المخبر.

الجدول (10). تحضير العينة لدراستها باستعمال جهاز محلل سمات الدنا.

المكونـات Components	الحجم النهـائي Final Volume 8 µl
Primers (10 p.mol/ µl) severally	1.0 µl
pET-Zp (200 ng)	1.0 µl
d.dH_2O	6.0 µl

6.1.3.2. التعبير البروتيني: *Protein over-expression*

تعد بكتريا الـ *E. coli* مضيفاً مناسباً للتعبير عن البروتينات الغريبة بكميات كبيرة خلال زمن قليل وبكلفة منخفضة، كما أنها تفتقر إلى عمليات التعديل التي تطرأ على البروتينات بعد انتهاء عملية الترجمة. فبعد استخلاص بلاسميد الـ pET-Zp من بكتريا الـ DH10β بواسطة Plasmid Midi kit (Qiagen) والحصول عليه بكميات كبيرة، أُدخِل هذا البلاسميد ضمن سلالتين من الـ *E. coli* خاصتين بالتعبير BL21(DE3) و BL21(DE3) pLysS بنفس الطريقة السابقة. كما أدخل بلاسميد pET-15b بمفرده وبلاسميد pET-Xyl كشاهدين سلبي وإيجابي على التوالي.

- **طريقة العمل:**

1. تنمية المستعمرات الحاوية على البلاسميدات الثلاثة السابقة الذكر في 3 ml من وسط الـ LB Broth مع إضافة الصاد الملائم بالتركيز المناسب ليلة كاملة بالدرجة 37 °م.
2. إضافة 200 µl من هذه المزرعة إلى مزرعة 20 ml من وسط التعبير (تمديد 100:1).
3. حضن في الدرجة 37 °م حتى الوصول للكثافة الضوئية ($O.D_{600}$) 0.5 ~.
4. إضافة الـ IPTG إلى وسط الزرع بعدة تراكيز نهائية وفقاً للجدول (11).
5. حضن في درجتي حرارة 25 °م و37 °م لمدة أربع ساعات، وليلة كاملة في الدرجة 18 °م مع الرج بسرعة 200 rpm.
6. قياس الكثافة الضوئية بعد كل ساعة لمراقبة معدل نمو الخلايا المضيفة خلال الزمن، كما يُأخذ 1 ml من المزرعة قبل التحريض وبعد كل ساعة من التحريض (تمدد العينة إذا زادت قيمة الكثافة الضوئية عن واحد للحصول على قراءة صحيحة).
7. تثفل العينات لمدة 5 دقائق بسرعة 14500 rpm، وتترك لتجف تماماً من آثار الوسط.
8. يحلّ الراسب بـ 20 µl من محلول الـ PBS 1X ليصبح مركزاً 50 مرة، مع الاحتفاظ بالطافي لمعاملته بمحلول الـ Trichloroacetic acid (TCA) من أجل ترسيب البروتينات المفرزة في الوسط. تُحفظ العينة بالدرجة 4 °م حتى موعد الترحيل.

الجدول (11). الشروط المطبقة عند التعبير البروتيني عن مورثة الزنك بروتياز ضمن بكتريا الـ *E. coli*.

	BL21 (DE3) plysS		BL21 (DE3)		
تركيز الـ IPTG (mM)	درجة الحرارة (℃)		درجة الحرارة (℃)		
	25	37	18	25	37
1.0	-	*	-	-	*
0.5	*	*	*	*	*
0.1	-	*	-	-	*
0.05	-	*	-	-	*
0.005	-	*	-	-	*
تركيز الغلوكوز (%) 0.5 / 1.0 / 2.0	-	-	-	-	*

- **المحاليل المستخدمة:**

  - **20% glucose:** 20 g glucose in 100 ml H_2O, Filter stterilize (0.22 µm)
  - **PBS 1X:** 101.4 mM $Na_2HPO_4.7H_2O$, 1.37 M NaCl, 17.6 mM KH_2PO_4, 27 mM PH to 6.7 (w/ HCl), Sterilize by autoclaving.
  - **100 mM IPTG (Promega)**: 0.238 g in 10 ml H_2O, Filter stterilize (0.22 µm).

7.1.3.2. مراقبة الخلايا بالمجهر الضوئي: *Light Microscopic observation*

أُخذت عينة من الخلايا قبل التحريض وبعد التحريض بساعتين وأربع ساعات، وتم تلوينها بصبغة غرام وذلك لمراقبة التغير في الشكل المورفولوجي الذي من الممكن أن يطرأ على الخلايا أثناء التعبير عن بروتين الزنك بروتياز باستخدام المجهر الضوئي (Olympus DP70).

- **طريقة التلوين:**

1. يُحضر الغشاء البكتيري باستحلاب جزء من المستعمرة ضمن قطرة ماء على صفيحة زجاجية.
2. يُغمر الغشاء البكتيري بعد تثبيته بالبلورات البنفسجية Crystal violet لمدة دقيقة. ومن ثمَّ يُغسل جيداً بالماء.
3. يُغمر الغشاء بمحلول اليود اليودي Lugol لمدة دقيقة. ومن ثم يغسل الغشاء جيداً بالماء.
4. يُغمر الغشاء بمزيل اللون لمدة 25 ثانية.
5. يُغمر الغشاء بملون الفوكسين لمدة 30 ثانية. ثم يغسل بالماء جيداً ويترك ليجف قبل فحصها بالمجهر.

8.1.3.2. حفظ المزرعة البكتيرية: *Stock culture maintenance*

تُحفظ مستعمرات بكتريا BL21 الحاوية على البلاسميد المرغوب، والتي تمَّ التعبير فيها بشكل جيد، لاستخدامها لاحقاً في التعبير البروتيني. هذه الطريقة تكفل عدم حدوث أي تغير في المستعمرة، لذلك تكون عمليات التعبير المستقبلية ذات فاعلية مثلى.

- **<u>طريقة العمل:</u>**

1. استنبات مستعمرة من BL21 حاوية على بلاسميد pET-Zp في 2-3 ml وسط LB Broth حاوي على الصاد المناسب بالدرجة 37 °م حتى الوصول لطور الثبات ($O.D_{600}$) 3.0 ~.
2. تثقيل 1 ml من المزرعة بسرعة 2000 rpm لمدة 5 دقائق، ومن ثمَّ حل الراسب بـ 1 ml وسط LB Broth جديد.
3. إضافة 500 µl من وسط LB 40% glycerol إلى 500 µl من المزرعة، وبذلك يصبح التركيز النهائي للغليسيرول في الوسط 20%.
4. تُحفظ الخلايا في ⁻80 °م لحين الاستخدام.

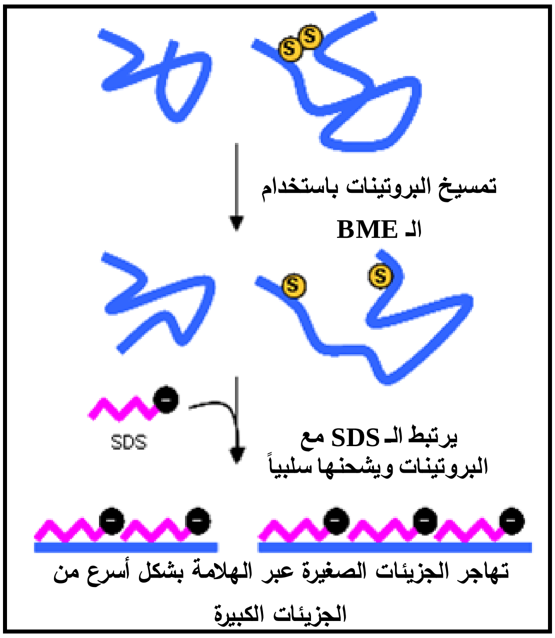
- **<u>المحاليل المستخدمة:</u>**

LB 40% glycerol: 4 ml glycerol Sterilized or filterlized to 6 ml LB Broth.

2.3.2. تقانات البروتين المؤشب: Recombinant protein techniques

1.2.3.2. الرحلان الكهربائي للبروتينات:*SDS-PAGE gel electrophoresis*

تعتبر تقنية **SDS-PAGE** (**s**odium **d**odecyl**s**ulfate **p**oly**a**crylamide **g**el **e**lectrophoresis) من أكثر الطرق التي تساعد على دراسة البروتينات شيوعاً، حيث تعتمد جميع تقنيات الرحلان الكهربائي على وجود التيار الكهربائي لتحريك الجزيئات المشحونة ضمن الهلامة، كما يحدث في رحلان الدنا على هلامة الآغاروز. ولكن، خلافاً لجزيئات الدنا المشحونة سلبياً، لا تحمل جميع البروتينات شحنة سلبية موحدة لذلك يتوجب إضافة مادة تعمل على تغطية جميع البروتينات بشحنة سلبية، وهذا هو دور الـ SDS والذي هو عبارة عن منظف غير أيوني سلبي الشحنة، يرتبط مع السلاسل الببتيدية مانحاً إياها شحنة سلبية موحدة، إضافةً إلى ذلك فإنه يساعد على تمسخ البروتينات حيث يقوم بتفكيك الروابط الثانوية والجسور غير الكبريتية في البنية الثالثية للبروتين، حيث إنه من الضروري تمسيخ البروتينات بشكلٍ كاملٍ قبل ترحيلها للحصول على الوزن الجزيئي الصحيح لها. كما يتم استخدام صبغة ترحيل Loading buffer حاوية على مكونين أساسيين وهما الـ SDS والـ β-Mercaptoethanol (BME) حيث يعمل الأخير كعامل مرجع يقوم بتفكيك الجسور الكبريتية. يساعد تسخين العينات في حمام مائي درجة حرارته 95 °م تقريباً في زيادة ارتباط الـ SDS مع البروتينات حيث ينتج في النهاية جزيئات بروتينية مشحونة سلبياً ذات بنية خطية تهاجر اعتماداً على أوزانها الجزيئية (الشكل 19).



الشكل (19). صورة لمعالجة البروتينات أثناء تحضير العينات للترحيل.

1.1.2.3.2. تحضير العينات البروتينية: Preparation of Protein samples

1. تؤخذ تراكيز متجانسة من كل عينة قبل التحريض وبعده.
2. إضافـــة صـــبغـة الـترحـيـل Loading buffer 4X الـحـاويـة عـلـى أزرق الـبـرومـوفــينــول Bromophenol blue (BPB) للاستدلال على انتهاء عملية الترحيل، إلى العينة المراد ترحيلها والتي تم حلها بمحلول الـ PBS 1X.
3. تسخن العينات في حمام مائي درجته 95 °م لمدة 5 دقائق.
4. تثقيل 5 دقائق بالسرعة 14500 rpm.

2.1.2.3.2. تحضير هلامة عديد الأكريلاميد: SDS PAGE preparation

بعد تحضير صفائح الترحيل الزجاجية وتثبيتها على الحامل المخصص لها، تُحضر هلامة سلفات دوديسيل الصوديوم عديد الأكريلاميد SDS-PAGE المؤلفة من هلامتين علوية وتدعى بهلامة التكديس Stacking gel بتركيز 4% وسفلية تدعى بهلامة الفصل Separating gel بتركيز 12%، يتغير هذا التركيز اعتماداً على الوزن الجزيئي للبروتين الهدف (الجدول 12).

الجدول (12). المحاليل الداخلة في تركيب هلامتي الفصل والتكديس.

المحاليل Solutions	هلامة الفصل Separating gel 12% (5 ml)	هلامة التركيز Stacking gel 4% (5 ml)
H_2O	1410 µl	2906 µl
40% Acrylamide (BioRad)	1458 µl	486 µl
2% bis Acrylamide (BioRad)	804 µl	268 µl
1.5M Tris-Hcl. PH 8.8	1250 µl	-
0.5 M Tris-Hcl. PH 6.8	-	1260 µl
10% SDS	50 µl	50 µl
10% APS	25 µl	25 µl
TEMED	5.0 µl	5.0 µl

- **طريقة العمل:**

1. مزج المكونات الموضحة في الجدول (12) لهلامة الفصل جيداً، ثم إضافة مركب رباعي ميثيل إيتيلين ثنائي الأمين Tetramethylethylenediamine (TEMED) الذي يساهم في تكوثر الهلامة بوجود محلول فوق سلفات الأمونيوم 10% Ammonium Persulfate (APS).
2. صب هلامة الفصل مباشرة بين الصفيحتين وتغطيتها بطبقة رقيقة من الإيزوبروبانول الذي يعمل على تسوية سطح الهلامة ومنع الأكسجين من الوصول إليها مما يؤدي إلى تأكسدها وبالتالي إعاقة تكوثرها.
3. سكب الإيزوبوتانول بعد تصلب الهلامة والغسل مكانه بالماء عدة مرات ومن ثم تجفيف الماء المتبقي بورقة ترشيح.
4. إضافة الـ TEMED إلى هلامة التكديس بعد تحضيرها والتي يتم صبها فوق هلامة الفصل ثمَّ يوضع المشط المناسب مباشرةً مع تجنب تشكل الفقاعات حول الآبار، وتترك حتى تتكوثر.
5. غسل الآبار بعد إزالة المشط بمحلول الترحيل ونقل الهلامة إلى حوض الترحيل الحاوي على محلول الترحيل Tris-glycine electrophoresis buffer.
6. إضافة 25 µl من العينة في كل بئر باستخدام إبرة هاملتون Hamilton syringe مع مراعاة غسلها جيداً بمحلول الترحيل بعد كل عينة، كما يتم ترحيل 5 µl واسمة الأوزان الجزيئية Protein marker لمعرفة الوزن الجزيئي للبروتين بالمقارنة معها.
7. تطبيق حقل كهربائي أولي جهده 80 V وعند وصول العينات إلى هلامة الفصل يُرفع الجهد إلى 110 V، حيث يتم الرحلان باتجاه القطب الموجب حتى وصول صبغة أزرق البروموفينول لأسفل الهلامة والذي يستغرق ساعتين تقريباً.

- **المحاليل المستخدمة:**

  - **1.5 M Tris-base Buffer:** (pH to 8.8 w/ HCl)
  - **0.5 M Tris-base Buffer:** (pH to 6.8 w/ HCl)
  - **10% (APS):** 100 mg/ml
  - **10% SDS:** 10 g/100ml, Heat to 68 ° C adjust pH to 7.2 w/ HCl
  - **Loading Buffer 4X:** 0.5 M Tris (pH 6,8), 10% SDS, 20% Glycerol and 0.04% Bromophenol Blue
  - **D1 Buffer (10 X):** 250 mM Tris Base and 2 M Glycine, autoclave
  - **Electrophoresis buffer (1 X) 1 L:** 100 ml D1 (10 X) and 10 ml 10% SDS
  - **Protein marker (Fermentase)**

3.2.3.2. تلوين الهلامة: *Coomassie Staining*

بعد انتهاء عملية الترحيل تُلون الهلامة بأزرق الكومازي Coomassie Brilliant Blue R-250 (Applichem) لمدة ساعة مع الرج بدرجة حرارة الغرفة، بعد ذلك تُغمر الهلامة في محلول مزيل اللون Destaning buffer حتى ظهور العصائب البروتينية بشكل واضح، عندها تُغسل الهلامة بالماء المقطر وتجفف بجهاز (BioRad-GEL DRYER) من أجل الاحتفاظ بها.

- **المحاليل المستخدمة**

  - **Coomassie Blue Staining solution:** 10% Acetic Acid, 45% Methanol, 250 mg Coomassie R250 and 45% H_2O
  - **Destaining solution:** 10% Acetic Acid, 45% Methanol and 45% H_2O

2.2.3.2. ترسيب البروتين بالـ TCA: *Trichloroacetic acid (TCA) precipitation*

- **طريقة العمل:**

1. إضافة 100 µl من حمض الخل ثلاثي الكلور TCA 100% لـ 1 ml من العينة للحصول على تركيز نهائي (10:1)، ويُمزج 15 ثانية.
2. حضن في الثلج 15–30 دقيقة.
3. تثفيل لمدة 10 دقائق بسرعة 14000 rpm والتخلص من الطافي.
4. غسل الراسب مرتين بإضافة 100 µl من الأسيتون والتثفيل 5 دقائق، مع التخلص من الطافي. يترك الأنبوب ليجف تماماً حيث إن وجود بقايا أسيتون يجعل إعادة حلّ الراسب صعباً.
5. حل الراسب بـ 50 µl من الـ PBS 1X، تُحفظ العينة بالدرجة 4 °م حتى موعد الترحيل.

3.2.3.2. تحديد فاعلية البروتياز على أطباق آغار الحليب:

Detection of Protease Activity on Milk Agar:

تتم زراعة 10 µl من البكتريا الحاوية على بلاسميد الـ pET-Zp وبلاسميد الـ pET-15b على وسط LB-Agar المضاف إليه حليب منزوع الدسم Skim milk بنسبة 1%، وذلك من أجل اختبار امتلاك مورثة الزنك بروتياز فاعلية تجاه حلّ البروتينات، عن طريق تشكل هالة شفافة حول المستعمرة بعد حضن الأطباق بالدرجة 37 °م لمدة تتراوح بين 24–48 ساعة.

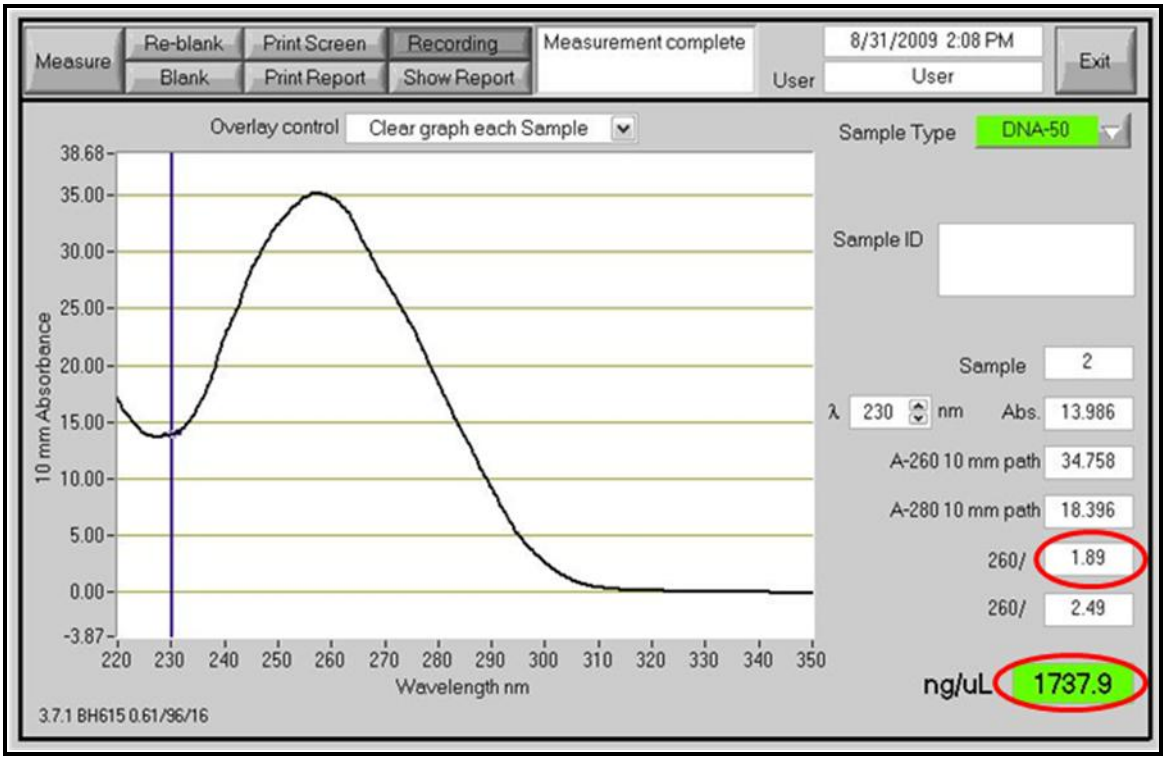
الفصل الثالث

النتائج والمناقشة

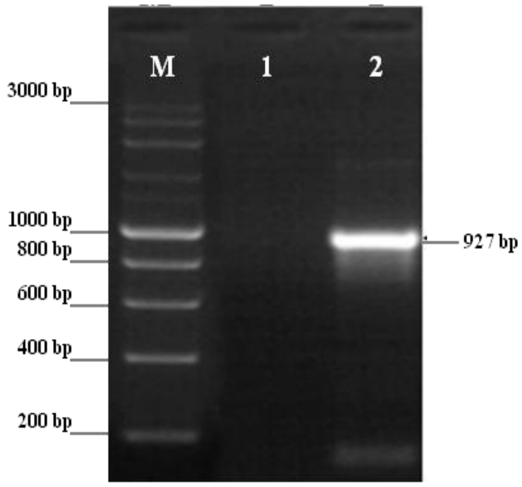
النتـــائـج والمنـاقشـة

1.3. عزل وتضخيم مورثة الـ zp: Isolation and amplification of *zp* gene

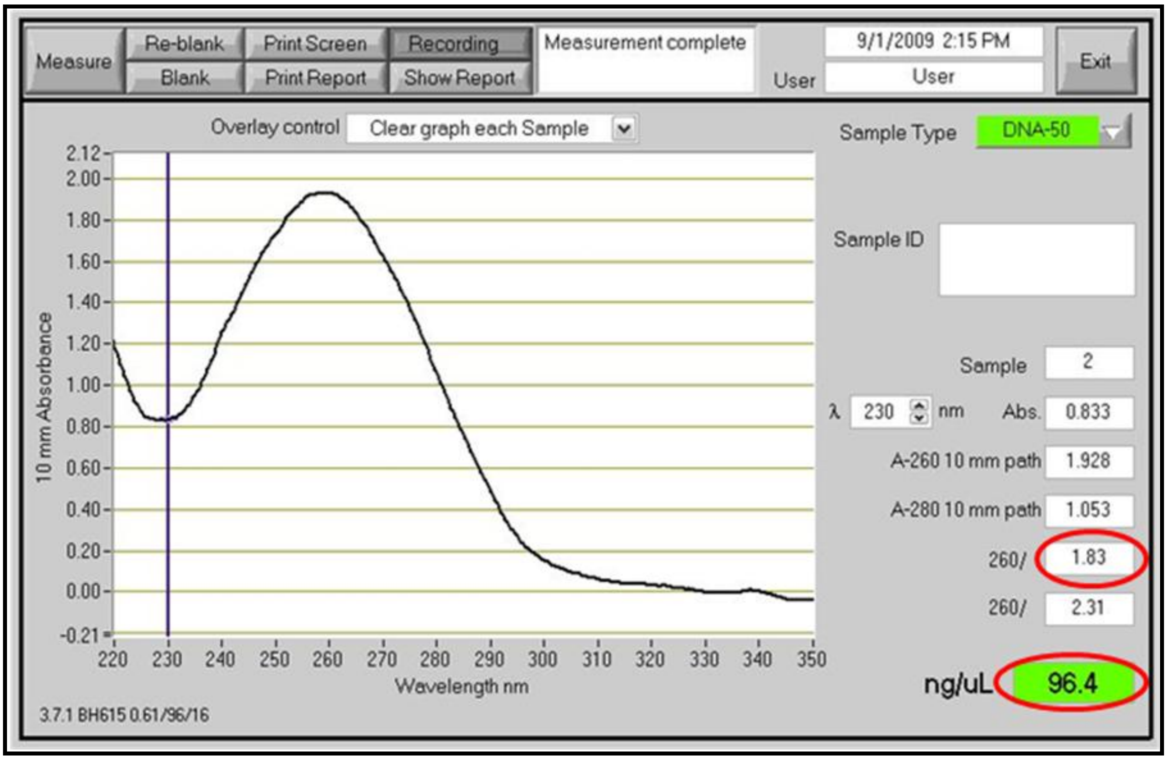
تمَّ استخلاص جينوم البروسيلا الضأنية وقياس تركيزه على طول موجة 260 نانومتر باستخدام جهاز الـ NanoDrop (Thermo) حيث بلغ تركيزه 1737.9 ng/µl (الشكل 20). عُزِلت فيما بعد مورثة الزنك بروتياز بواسطة تقانة الـ PCR باستخدام الدنا الجينومي للبروسيلا الضأنية كقالب ومرئسات نوعية مصممة اعتماداً على تسلسل المورثة المأخوذ من البنك الجينومي (GenBank NO.AE008917.1) حيثُ تبين تبعاً لاختبار الرحلان الكهربائي على هلامة الآغاروز 1.5% أن طول شدفة الدنا الناتجة يبلغ 927 bp (الشكل 21) وهذا ما يُوافق تسلسل المورثة في قاعدة بيانات الـ NCBI. تُرمز هذه المورثة سلسلة متعدد ببتيد مؤلفة من 308 ثمالة حمض أميني، إضافةً إلى أن الحجم المتوقع نظرياً للبروتين الناتج اعتماداً على تسلسل الحموض الأمينية يبلغ تقريباً 33 kDa (ExPASy Proteomics Server). تمت تنقية ناتج التضخيم عن طريق استخلاصه من الهلامة ومن ثمَّ قيس تركيزه على طول موجة 260 nm حيث بلغ تركيزه نحو 96.4 ng/µl (الشكل 22).



الشكل (20). منحني يوضح تركيز ونقاوة الدنا الجينومي المستخلص. يبلغ التركيز 1737.9 ng/µl عند طول موجة 260 nm في حين تبلغ درجة النقاوة 1.8 عند طول موجة 260/280.



الشكل (21). صورة هلامة الآغاروز 1.5% توضح عصابة مورثة الزنك بروتياز بعد تضخيمها بطول 927 bp. حيث تمّ إظهارها باستخدام الأشعة فوق البنفسجية. M: واسمة عصابة معيارية، 1: شاهد سلبي، 2: مورثة الزنك بروتياز.



الشكل (22). منحني يوضح تركيز ونقاوة مورثة الزنك بروتياز المُضخمة بواسطة الـ PCR. حيث يبلغ التركيز ng/µl 96.4 عند طول موجة nm 260 في حين تبلغ درجة النقاوة 1.8 عند طول موجة 260/280.

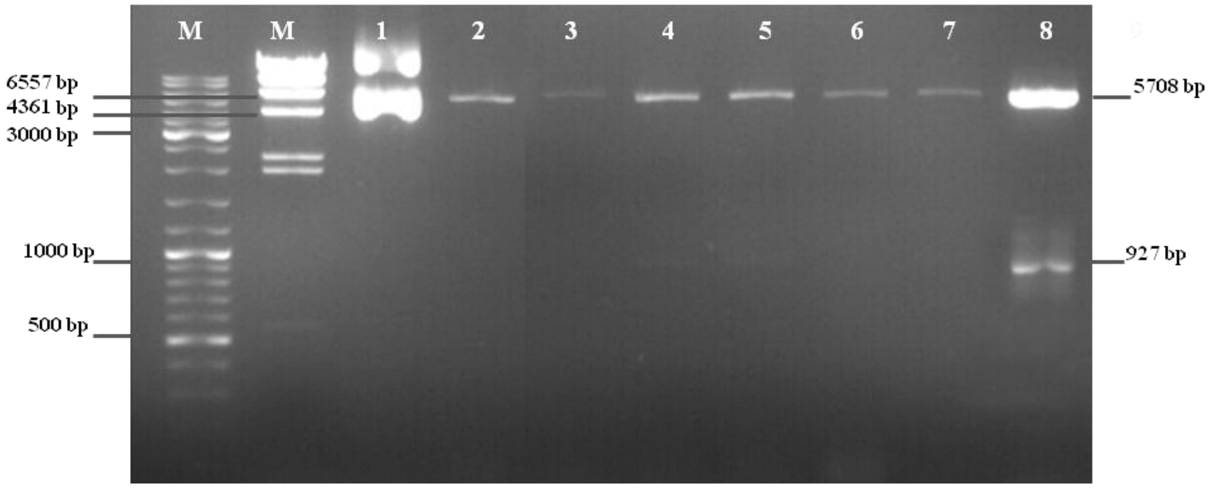
2.3. تنسيل مورثة الـ *zp*: Cloning of *zp* gene

1.2.3. أنزيمات التقييد والربط: Restriction and ligation enzymes

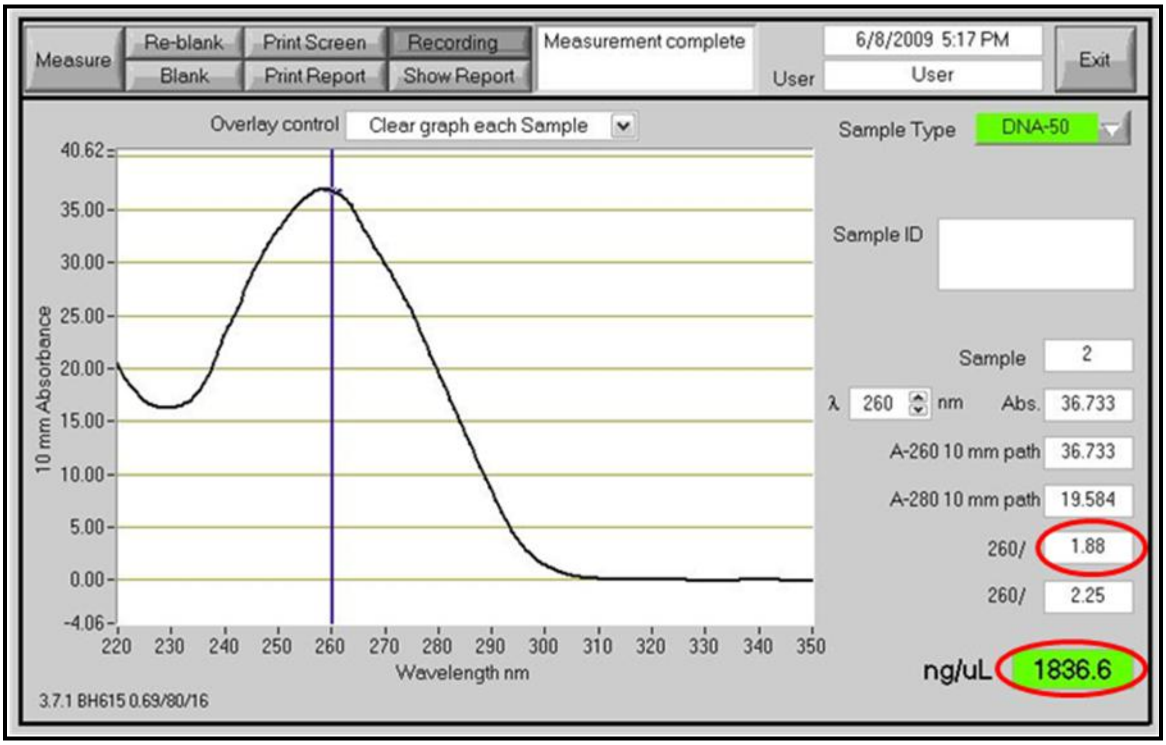
بعد نجاح عملية التضخيم والحصول على المورثة بشكلٍ نقي، تمَّ تنسيلها ضمن بلاسميد الـ pET-15b وذلك بمعاملة المورثة والبلاسميد بأنزيمي التقييد NdeI وBamHI (Fermentas) للحصول على نهايات متوافقة مما يُمكِنها من الارتباط سويةً أثناء تفاعل الربط. رُحِّل ناتج تفاعل القطع على هلامة الآغاروز 1.5% وقُصَّ مباشرةً بسرعة وعلى طول موجة 365 nm لتجنب حدوث طفرة ما أثناء التعرض للأشعة فوق البنفسجية. ليتم فيما بعد تنقية الشدفة والبلاسميد وقياس تركيزهما باستخدام جهاز الـ NanoDrop (Thermo) والذي بلغ 18.2 ng\µl و26.2 ng\µl على التوالي. ومن ثمَّ استخدم أنزيم الربط T4 DNA ligase (Fermentas) لربط المورثة إلى البلاسميد للحصول في النهاية على البلاسميد المؤشب pET-Zp، و إدخاله ضمن بكتريا الـ DH10β *E. coli* الخاصة بالتنسيل بعملية التحول البكتيري حيث تمت تنمية هذه البكتريا على وسط إنتقائي حاوٍ على الأمبسلين، وذلك لتمييز الخلايا الحاوية على البلاسميد الذي يمتلك صفة المقاومة لهذا الصاد.

2.2.3. التأكد من نجاح عملية التنسيل ضمن بلاسميد pET-15b:

تمَّت تنمية عدد من المستعمرات النامية على الطبق الحاوي على الأمبسيلين واستخلاص البلاسميد منها بواسطة الـ Mini-prep، قُطع البلاسميد المستخلص فيما بعد باستخدام أنزيمي NdeI وBamHI وذلك من أجل انتقاء المستعمرات الحاوية على البلاسميد المؤشب pET-Zp. رُحِل الناتج على هلامة الآغاروز، حيث حصلنا على شدفتين الأولى بطول 927 bp وهي تمثل المورثة المرغوبة والثانية بطول 5700 bp تقريباً، وهذا ما يمثل البلاسميد، مما يؤكد نجاح تفاعل الربط ودخول الشدفة في مكانها الصحيح (الشكل 23). استنبتت المستعمرات الإيجابية بمزرعة أكبر وتم استخلاص البلاسميد منها باستخدام Plasmid Midi kit (Qiagen) للحصول على بلاسميد عالي النقاوة وبكميات كبيرة لادخاله في البكتريا الخاصة بالتعبير، حيث بلغ تركيزه 1836.6 ng\µl (الشكل 24). أُدخل هذا البلاسميد فيما بعد ضمن سلالات الـ *E. coli* الخاصة بالتعبير عن البروتينات الهدف بكميات كبيرة مثل: BL21(DE3) والـ BL21(DE3) plysS.



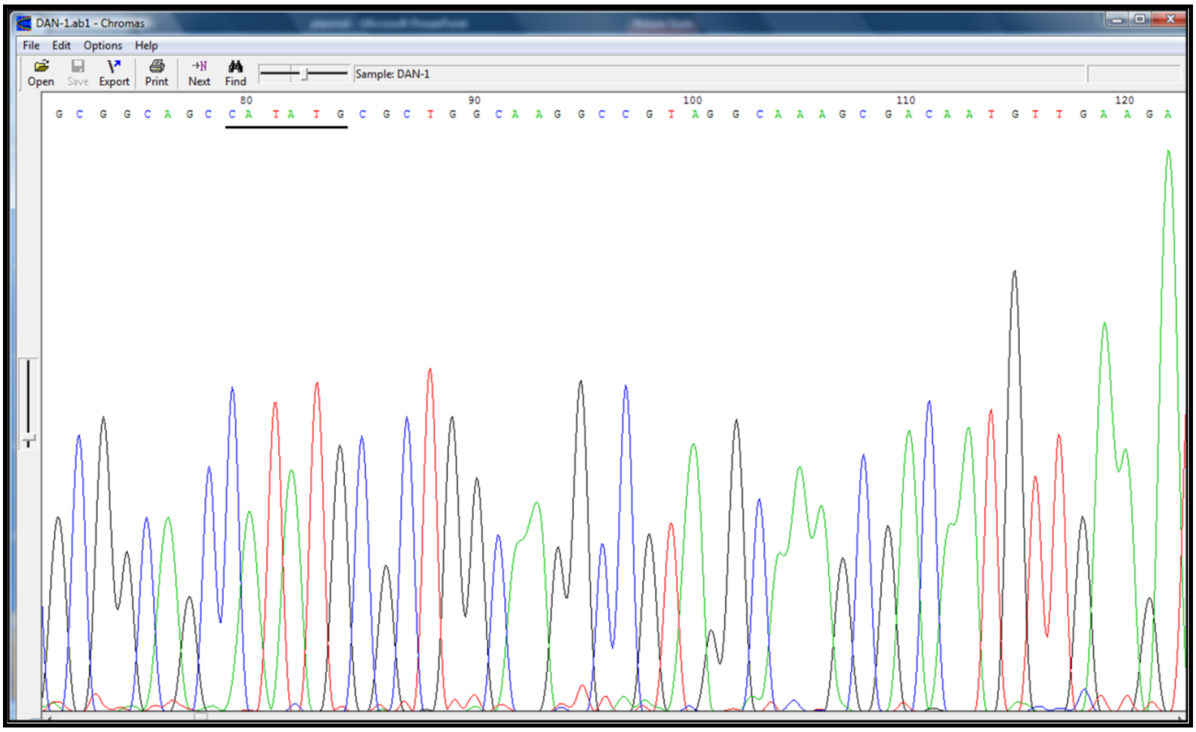
الشكل (23). صورة لهلامة الآغاروز 1.5% توضح نـاتج تفاعل القطع للبلاسميد المستخلص وذلك بعد معاملتـه بأنزيمي NdeI وBamHI. حيث يمثل (M) واسمتي عصـائب معيـارية 100bp و Hind III λ على التوالي. المسار (1): بلاسميد pET-15b قبل القطـع. المسار (7 ,6 ,5 ,4 ,3 ,2): بلاسميد pET-15b مقطوع غير حاوي على المورثة. المسار (8): بلاسميد pET-Zp مقطوع حاوي على مورثة الـ *zp*.



الشكل (24). منحنـي يوضـح تركيـز ونقـاوة بلاسـميد الـ pET-zp بعد استخلاصـه. حيـث يـبلغ الـتركيز 1836.6 ng/µl عند طول موجة 260 nm في حين تبلغ درجة النقاوة 1.8 عند طول موجة 260/280.

3.3. تحديد تسلسل بلاسميد الـ pET-Zp: pET-Zp Sequencing

تم تحديد التسلسل الحقيقي لمورثة الزنك بروتياز التي تم تنسيلها ضمن بلاسميد الـ pET-15b بين أنزيمي BamHI و NdeI باستخدام جهاز محلل سمات الدنا (310 Genetic analyzer ABI Prism) من شركة Applied Biosystem، حيث تبين خلو بلاسميد الـ pET-Zp من أي طفرة من الممكن أن تحدث أثناء عملية التنسيل، وذلك بمقارنة التسلسل الناتج مع التسلسل الموجود في قاعدة بيانات الـ NCBI باستخدام برنامج Chromas 2، مما يؤكد اندراج هذه المورثة في مكانها الصحيح ضمن البلاسميد، والذي يسمح بالتعبير عنها والحصول على البروتين المرمزة له لاحقاً، إضافةً إلى تطابق التسلسل الناتج مع التسلسل الافتراضي المأخوذ من البنك الجينومي (GenBank NO.AE008917.1) (Zaiter *et al*., 2010) (الشكل 25).



الشكل (25). مخطط رحلاني Electropherogram لناتج التضخيم الذي فُصل باستخدام جهاز محلل سمات الدنا. حيث تدل كل قمة على نوع من النكليوتيدات. أحمر: تيميدين T، أخضر: أدينين A، أسود: غوانين G، أزرق: سيتوزين C.

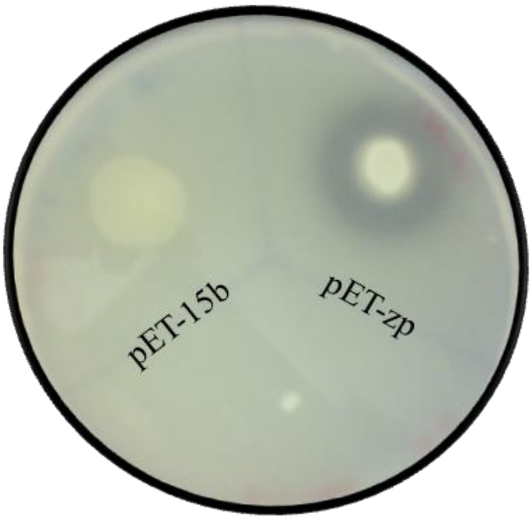
هذا ما يتوافق مع دراسات سابقة حيث قام Kim وزملائه بتضخيم الشدفة المرمزة للبروتياز المعدنية بطول bp 2442 باستخدام الدنا الجينومي كسلسلة قالب، ومن ثمَّ تمَّ تنسيل هذه المورثة ضمن بلاسميد الـ pBluescript SK(+)، أُدخل هذا البلاسميد إلى بكتريا الـ *E. coli* JM109 بعملية التحول البكتيري (Kim *et al*., 2002).

كما قام Teo وزملائه بتنسيل مورثة البروتياز المعدنية بطول bp 2034 والمأخوذة من بكتريا الـ *Vibrio harveyi* ضمن بلاسميد pUC18، نُسل هذا البلاسميد ضمن بكتريا الـ *E. coli* TOP10 (Teo *et al*., 2003).

4.3. تحديد فاعلية البروتياز على أطباق آغار الحليب:

Detection of Protease Activity on Milk Agar:

تم تحديد هوية هذا البروتين كبروتياز عند استنبات السلالات التي تضم البلاسميد الحاوي مورثة الزنك بروتياز الـ pET-Zp على وسط LB-Agar الحاوي على حليب منزوع الدسم Skim milk بنسبة 1%، حيث تبين امتلاك هذه الخلايا فاعلية تجاه حل البروتينات الموجودة ضمن الآغار، وذلك نتيجة احتوائها على المورثة المرمزة للبروتياز والتي تعمل على تفكيك الحليب مشكلةً هالةً شفافة حول المستعمرة المزروعة وذلك خلافاً للسلالات الحاوية على بلاسميد الـ pET-15b والتي لم تُشكل أية هالة نتيجة لغياب المورثة في البلاسميد المذكور (الشكل 26).



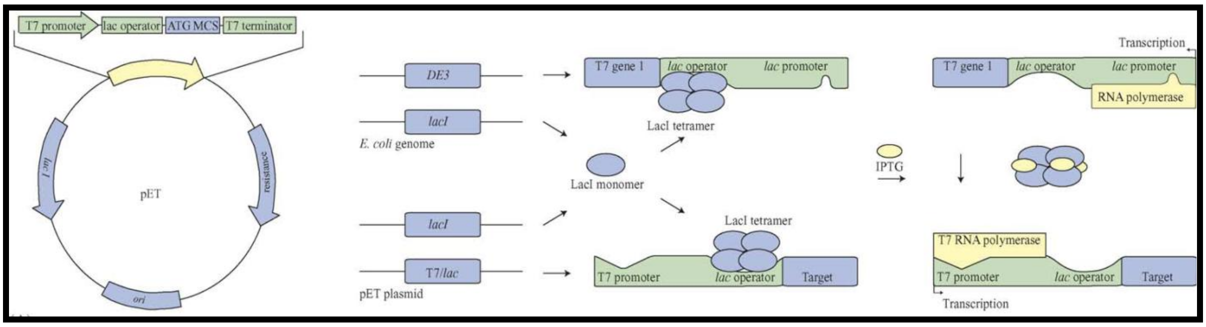
الشكل (26). طبق حاوي على وسط skim milk 1% LB-Amp نميت عليه بكتريا الـ *E. coli* BL21(DE3)، وحضن في الدرجة 37 °م لمدة 16 ساعة.

وهذا ما يتوافق مع دراسات سابقة حيث قام Teo وزملائه بتنمية خلايا الـ *E. coli* TOP10 الحاوية على مورثة البروتياز المعدنية ضمن بلاسميد pUC18، ولمعرفة المستعمرات الحاوية على المورثة الهدف، نميت هذه الخلايا على أطباق حاوية على حليب منزوع الدسم بنسبة 2% حيث تبين أن المستعمرات التي أظهرت فاعلية على الأطباق هي التي تحمل البلاسميد المؤشب (Teo *et al*., 2003).

كما قام Karbalaei-Heidari وزملائه بتنمية خلايا الـ *E. coli* XL-1blue الناتجة عن عملية التحول البكتيري لبلاسميد (+) pBluescript II KS على أطباق LB-Amp بعد إضافة الحليب منزوع الدسم إليها بنسبة 2% لمدة تتراوح بين 48–72 ساعة في الدرجة 37 °م، وذلك من أجل انتقاء المستعمرات التي تمتلك فاعلية تجاه حل البروتينات الموجودة في الوسط مشكلةً هالة حول المستعمرة الإيجابية (Karbalaei-Heidari *et al*., 2007).

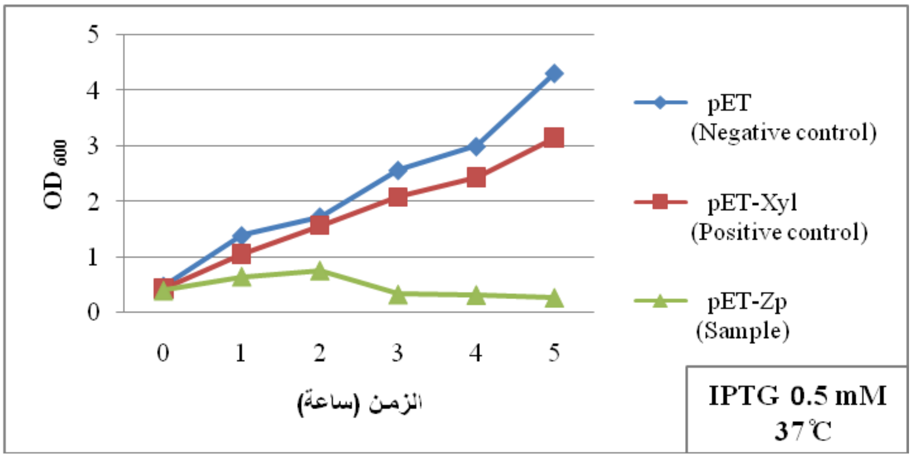
5.3. التعبير البروتيني: Protein over-expression

بعد التأكد من تسلسل مورثة الزنك بروتياز واندراجها في مكانها الصحيح ضمن بلاسميد الـ pET-Zp، تمَّ إدخال هذا البلاسميد ضمن سلالتين من بكتريا الـ *E. coli* خاصتين بالتعبير هما الـ BL21(DE3) والـ BL21(DE3) plysS بعملية التحول البكتيري، حيث تم تحريض التعبير عن مورثة الزنك بروتياز باستخدام هاتين السلالتين لامتلاكهما شدفة من الدنا مأخوذة من ملتهم الجراثيم λ تدعى بالـ DE3 والتي تضم ثلاث مورثات منها المورثة المرمزة لأنزيم T_7 RNA Polymerase الضروري لبدء عملية انتساخ المورثة الهدف. تتم السيطرة على هذه المورثة عن طريق محضض الـ *LacUV5* الموجود في صبغي البكتريا والذي يتفعل عند إضافة الـ IPTG، حيث يُحفز تحرر جزيئة الـ LacI monomer المرتبطة مع المُشغل *Lac* operator والذي يقوم بالارتباط معها مما يُحفز بدء عملية انتساخ أنزيم الـ RNA Polymerase وبالتالي تبدأ عملية التعبير عن المورثة الهدف (الشكل 27). إلا أن ما يميز السلالة BL21(DE3) plysS هو امتلاكها لبلاسميد حاوي على المورثة المقاومة للكلورامفينكول إضافةً للمورثة المرمزة لأنزيم الـ T_7 lysozyme والذي يعتبر مثبطاً طبيعياً للـ T_7 RNA Polymerase وبالتالي مثبطاً لبدء عملية النسخ قبل التحريض مما يكبح ارتشاح البروتين ويقلل من سميته على الخلايا (Studier *et al*., 1990).

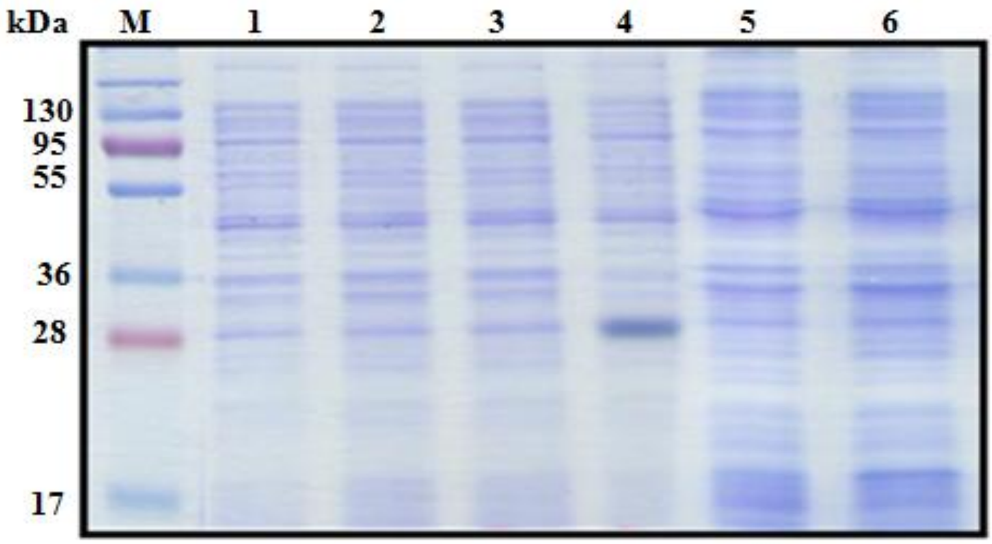


الشكل (27). صورة توضيحية لآلية التعبير في نظام التعبير pET ضمن خلايا الـ BL21 *E. coli*، حيث ترمز مورثة *Lac I* الموجودة في صبغي البكتريا وفي البلاسميد بروتين كابح LacI monomer يرتبط مع المشغل مثبطاً عملية نسخ أنزيم الـ RNA Polymerase، وعند التحريض يرتبط الـ IPTG المُضاف مع هـذا الـبروتين مانعاً إياه من الارتـباط مع الـمشغل لـتبدأ عـملية نـسـخ الـ RNA Polymerase، وبما أن أنزيم الـ T7 RNA Polymerase نوعي تجاه محضض T7 الموجود ضمن البلاسميد عندها يبدأ التعبير عن المورثة الموجودة ضمن بلاسميد التعبير.

تمت عملية التعبير ضمن سلالتي الـ BL21(DE3) والـ plysS BL21(DE3) باستخدام تراكيز مختلفة من الـ IPTG ودرجات حرارة متنوعة لتحديد الشروط المثلى لنجاح التعبير عن هذا البروتياز. تمَّ تحريض التعبير بدايةً ضمن سلالة الـ BL21(DE3) عندما بلغت الكثافة الضوئية (OD_{600}) للخلايا 0.5 بالدرجة 37 °م وبتركيز نهائي للـ IPTG يبلغ 0.5 mM، حيث أظهرت هذه السلالة بعد مرور ساعتين من التحريض انخفاض معدل نمو الخلايا وانخفاض كثافتها الضوئية مقارنةً مع الشاهد الإيجابي pET-Xyl والشاهد السلبي pET-15b (الشكل 28). كما لم يُظهر الرحلان الكهربائي على هلامة الـ SDS-PAGE لبروتينات البكتريا الحاوية على بلاسميد الـ pET-Zp أي أثر لبروتين الزنك بروتياز بوزنه الجزيئي المحدد نظرياً 33kDa (Zaiter *et al*., 2010) وذلك خلافاً للبكتريا الحاوية على بلاسميد pET-Xyl الذي يُمثِل الشاهد الإيجابي والتي أعطت بروتيناً بالوزن الجزيئي المعلوم 28 kDa (Al Balaa *et al*., 2006). لم يُلاحظ أيضاً وجود بروتين الزنك بروتياز في طافي المزرعة عند معاملته بالـ TCA (الذي يعمل على ترسيب البروتينات الموجودة بالوسط) (الشكل 29).

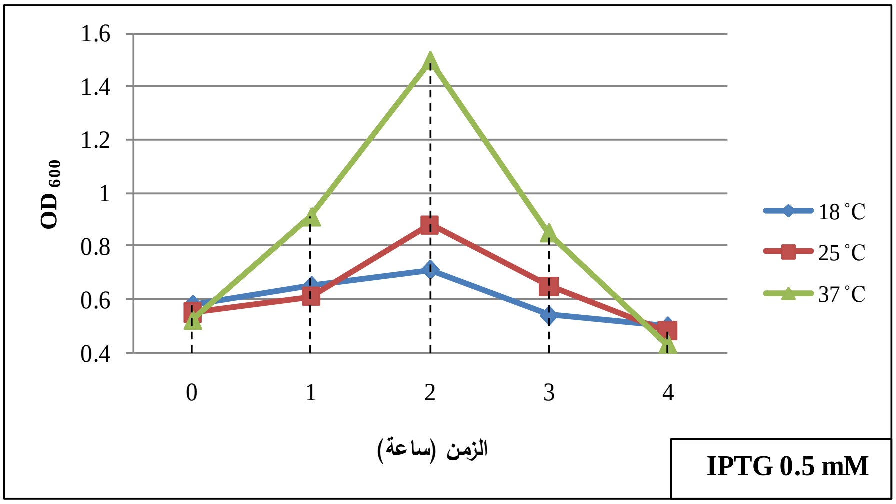


الشكل (28). منحني يوضح تناقص مستوى الكثافة الضوئية لبكتريا الـ BL21(DE3) *E. coli* الحاوية على بلاسميد الـ pET-Zp بعد ساعتين من التحريض. وذلك بمقارنة الكثافة الضوئية للبكتريا الحاوية على بلاسميد الـ pET-Zp مع الشاهدين الايجابي (pET-Xyl) والسلبي (pET-15b) بالدرجة 37 °م، حيث أضيف الـ IPTG إلى الوسط بتركيز نهائي 0.5 mM عندما بلغت الكثافة الضوئية 0.5 OD_{600}.

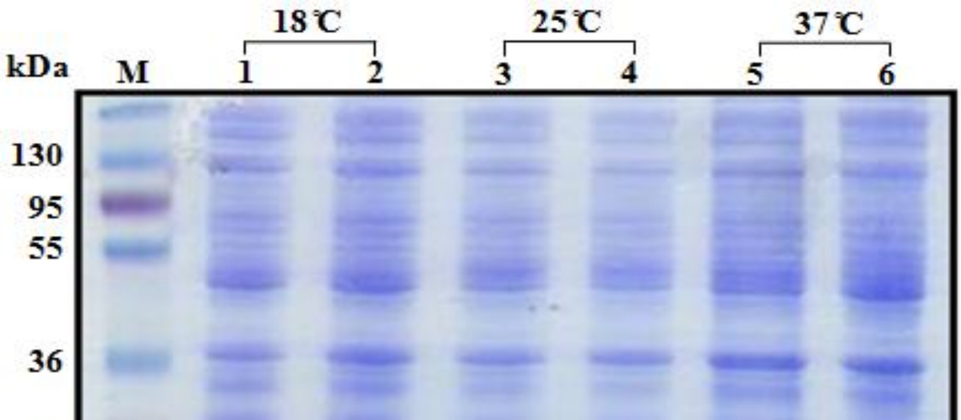


الشكل (29). هلامة الـ SDS-PAGE لناتج التعبير ضمن بكتريا الـ BL21 (DE3) *E. coli*، حيث تبين بروتينات البكتريا الحاوية على بلاسميدي الـ pET-Xyl والـ pET-15b إضافةً إلى بلاسميد الـ pET-zp على التوالي، قبل التحريض (مسار 1، 3، 5) وبعد التحريض بأربع ساعات (مسار2، 4، 6)، يمثل المسار (M) البروتينات المحددة الطول في سلم البروتينات الجزيئي.

فيما بعد تمَّ التعبير ضمن بكتريا الـ BL21 (DE3) بالدرجة 18 °م و25 °م و 37 °م بإضافة الـ IPTG بتركيز نهائي 0.5 mM، ولكن لوحظ أيضاً انخفاض الكثافة الضوئية للمزرعة بعد ساعتين من التحريض (الشكل 30)، كما لم يُظهر الرحلان الكهربائي للعينات على هلامة الـ SDS-PAGE أية فروق ملحوظة بين بروتينات البكتريا قبل التحريض وبعده في جميع درجات الحرارة المطبقة بعد تلوينها بأزرق الكومازي (الشكل 31).



الشكل (30). منحني يوضح تناقص مستوى الكثافة الضوئية لبكتريا *E. coli* BL21(DE3) الحاوية على بلاسميد الـ pET-Zp بعد ساعتين من التحريض وذلك عند تحريض التعبير في عدة درجات من الحرارة بتركيز نهائي للـ IPTG يبلغ 0.5 mM عندما بلغت الكثافة الضوئية 0.5 OD_{600}.

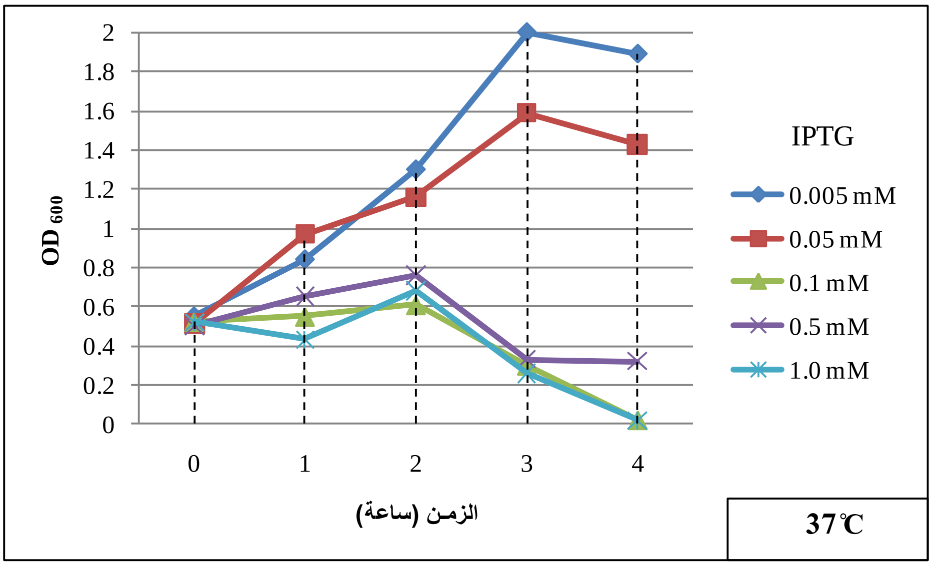


الشكل (31). هلامة الـ SDS-PAGE لنـاتج التعبير ضمن بكتريا الـ *E. coli* BL21 (DE3) باستخدام عدة درجات من الحرارة، حيث تظهر الهلامة البروتينات قبل التحريض (مسار 1، 3، 5) وبعد التحريض ليلة كاملة (مسار2، 4) وأربع ساعات (مسار 6). يمثل المسار (M) البروتينات المحددة الطول في سلم البروتينات الجزيئي.

تبين أيضاً أن تركيز الـ IPTG يؤثر على عملية التعبير، لذلك تمَّ تحريض الـتعبير عن البروتين الهدف ضمن بكتريا الـ BL21 (DE3) في الدرجة 37 °م باستخدام تراكيز متدرجة من الـ IPTG، وهي: (1.0 mM, 0.5 mM, 0.1 mM, 0.05 mM, 0.005 mM)، حيث تبين أن استخدام تراكيز منخفضة من الـ IPTG (0.05mM, 0.005 mM) قد أطال في عمر البكتريا، فقد بدأت الكثافة الضوئية

بالانخفاض بعد ثلاث ساعات من التحريض وذلك خلافاً لتراكيز الـ IPTG الأخرى التي بدأت فيها الكثافة الضوئية بالانخفاض بعد ساعتين من التحريض (الشكل 32). كما لم يُظهر الرحلان الكهربائي للعينات على هلامة الـ SDS-PAGE أية فروق ملحوظة بين بروتينات البكتريا قبل التحريض وبعده في جميع تراكيز الـ IPTG.

تمت إضافة تراكيز مختلفة من الغلوكوز (0.5, 1.0, 2.0%) إلى الوسط عند التعبير بالدرجة 37 °م وبتركيز نهائي للـ IPTG يبلغ 0.5 mM، تتم إضافة الغلوكوز عند التعبير عن البروتينات المشتبه بسميتها على خلايا الـ *E. coli* BL21(DE3) وذلك بهدف الحفاظ على بقاء البلاسميد ضمن هذه الخلايا إضافةً إلى تثبيط ارتشاح البروتين إلى وسط التعبير قبل التحريض مما يُقلل من سميته على الخلايا. وبما أن للغلوكوز دور في السيطرة على عملية التعبير، وذلك من خلال تثبيط أنزيم Adenyl cyclase الذي يدخل في إنتاج الـ Cyclic adenosine monophosphate (cAMP) الضروري في بدء عملية الانتساخ. حيث يرتبط الـ cAMP ضمن الخلية مع الـ Catabolite activator protein (CAP) في غياب الغلوكوز مشكلاً معقد الـ CAP/cAMP، والذي يتجه نحو مكان محدد ضمن المحضض محفزاً بدء عملية الانتساخ (Novy and Morris, 2001). وهذا ما يؤكد سمية البروتين الهدف على البكتريا حيث إن تثبيط التعبير عنه بإضافة الغلوكوز أدى إلى استمرار نمو البكتريا وعدم تأثرها كما حدث في التجارب السابقة.

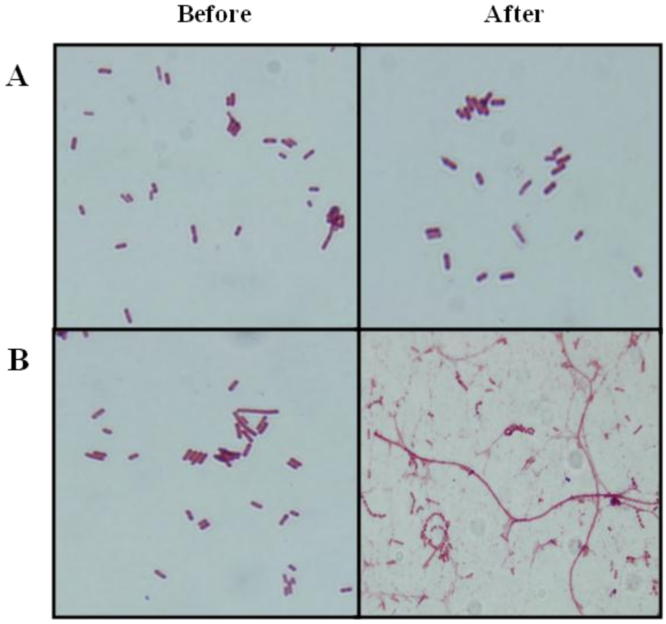


الشكل (32). منحني يوضح تناقص مستوى الكثافة الضوئية لبكتريا *E. coli* BL21(DE3) الحاوية على بلاسميد الـ pET-Zp بعد ساعتين من التحريض بالدرجة 37 °م. بإضافة تراكيز مختلفة من الـ IPTG.

وانطلاقاً من أن البروتين المعبر عنه يتمتع بسمية تؤدي إلى موت البكتريا. تم اللجوء إلى التعبير عنه في نظام تعبير آخر ضمن بكتريا الـ BL21 (DE3) plysS، والذي يستعمل غالباً في التعبير عن البروتينات السامة وذلك عن طريق تقليل ارتشاح البروتين السام المعبر وفق الآلية التي تم شرحها مسبقاً. حيث لوحظ بعد مرور ساعتين من التحريض انخفاض معدل نمو الخلايا وانخفاض كثافتها الضوئية مقارنةً مع الشاهد الإيجابي pET-Xyl والشاهد السلبي pET-15b، باستثناء انخفاض الكثافة الضوئية بعد ثلاث ساعات من التحريض عند استخدام تراكيز منخفضة من الـ IPTG، وهذا يوافق النتيجة التي تمَّ الحصول عليها عند التعبير باستخدام بكتريا الـ BL21 (DE3).

تدل هذه النتيجة أن مورثة الزنك بروتياز ترمز بروتيناً ساماً للخلايا يسبب تواجده في الوسط تفكيك الخلايا المضيفة وموتها. حيث بين Fozo وزملائه أن تصنيف بروتين ما بأنه سام يعتمد على ارتباط تواجده مع موت الخلايا والذي يقاس بانخفاض الكثافة الضوئية وعدم المقدرة على تشكيل المستعمرات (Fozo *et al*., 2008).

من الممكن أيضاً أن يكون سبب حدوث هذه الظاهرة هو حدوث موت خلوي مبرمج للخلايا المضيفة أو ما يُدعى بالـ Apoptosis أثناء عملية التعبير، يعود سبب هذا الموت إلى مساهمة أنزيمات البروتياز في هذه العملية. والتي من الممكن أن تُحفِز بِدأها، حيث يسبب تفعيلها تفكيك معظم البروتينات الخلوية والذي ينتج عنه الموت الكيميائي الحيوي للخلية إضافةً إلى حدوث تغيراتٍ في الشكل المرفولوجي للخلايا (Lee *et al*., 2000). فقد لوحظ حدوث تغير في الشكل المورفولوجي لبكتريا الـ BL21(DE3) الحاوية على بلاسميد الـ pET-Zp بعد التعبير عن مورثة الزنك بروتياز مقارنةً بشكلها قبل بدء التعبير إضافةً إلى مقارنتها مع بكتريا الـ BL21(DE3) الحاوية على بلاسميد الـ pET-15b، حيث أظهرت خلايا الـ *E. coli* الحاوية على بلاسميد الـ pET-15b شكلاً نموذجياً (عصوي كروي) قبل بدء عملية التعبير وبعدها (الشكل 33 A)، في حين طرأ تغير على شكل الخلايا الحاوية على بلاسميد الـ pET-Zp بعد التعبير عن بروتين الزنك بروتياز (الشكل 33 B) حيث أصبحت الخلايا أكثر استطالة، وهذا ما يتوافق مع نتائج Anilkumar وزملائه بالتعبير عن مورثة الـ FtsH المرمزة لأنزيم الزنك بروتياز لدى بكتريا الـ *Mycobacterium smegmatis* في بكتريا الـ *E. coli* C41، حيث تبين وجود سمية لهذا البروتين على خلايا الـ *E. coli* أثناء عملية التعبير والذي أدى إلى تثبيط شديد لنمو الخلايا إضافةً إلى استطالتها Filamentation. كما لم يظهر أي أثر للبروتين المعبر عنه على هلامة الـ SDS-PAGE (Anilkumar *et al*., 2004).



الشكل (33). صورة بالمجهر الضوئي (OLYMPUS DP 70).يوضح التغير المورفولوجي لخلايا الـ *E. coli* BL21(DE3) قبل التحريض وبعده بثلاث ساعات بإضافة 0.5 mM IPTG (A) خلايا حاوية على بلاسميد الـ pET-15b، (B) خلايا حاوية على بلاسميد الـ pET-Zp.

في دراسة أخرى لوحظ فيها حدوث تغيرٍ في شكل البكتريا إضافةً إلى تثبيط نموها أثناء عملية التعبير. فكما هو معروف تبدأ محاولة إنتاج كميات كبيرة من البروتين بوضع المورثة المرغوبة تحت سيطرةٍ محضضٍ جيد وإدخالها ضمن بلاسميدات متعددة الانتساخ Multicopy plasmids وهي بلاسميدات تمت هندستها من أجل إنتاج كمياتٍ كبيرةٍ من البروتين، فقد تبين أنه غالباً ما ينتج لدينا بكتريا عليلة Sick bacteria، حيث قام بعض المخبريين بدراسة المزرعة أثناء التعبير ووجدوا أن سلوك البكتريا المحرضة كان غريباً، فقد نمت في البداية ببطء (Tubulekas and Hughes, 1993) ومن ثمَّ أنتجت كمياتٍ جيدة من بروتينات الصدمة الحرارية (Dong *et al.*, 1995; Vind *et al.*, 1993) ليتوقف فيما بعد نموها تماماً (Dong *et al.*, 1995)، يفسر ذلك أن فرط التعبير عن بروتين ما أثر على التعبير عن بروتينات أخرى ضروريةٍ للخلية، حيث تكون البكتريا غير قادرةٍ على النمو بشكلٍ طبيعي، لأن كمية البروتينات الوظيفية المتراكمة انخفضت كثيراً واستبدلت بالبروتين الذي تمَّ تحريضه (Birnbaum and Bailey, 1991).

الإستنتاجات
CONCLUSION

1. تم تنسيل مورثة الـ *zp* المعزولة من جينوم البروسيلا الضأنية 16M والتي يبلغ طولها 927 bp، تُرمز هذه المورثة بروتين مؤلف من 308 ثمالة حمض أميني.
2. تسلسل هذه المورثة مطابق لتسلسل مورثة الزنك بروتياز لدى سلالة 16M المأخوذة من البنك الجينومي.
3. ترمز مورثة الـ *zp* التي تمَّ تنسيلها بروتيناً تمَّ تحديد هويته على أنه بروتياز الشيء الذي كان افتراضياً (مقارنة مع تسلسله في المتعضيات الأخرى) وقمنا بإثباته للمرة الأولى عمليًا (بتحديد فاعليته على الأطباق).
4. ترمز مورثة الزنك بروتياز بروتيناً ساماً للخلايا يسبب تواجده في الوسط تفكيك الخلايا المضيفة وموتها، الأمر الذي حال دون الحصول على هذا البروتين عند التعبير عنه ضمن خلايا الـ *E. coli* رغم تطبيق العديد من الشروط.

التوصيات
RECOMMENDATION

من الممكن استناداً إلى النتائج السابقة اقتراح التوصيات التالية:

1. محاولة التعبير عن المورثة المرمزة لأنزيم الزنك بروتياز ضمن أنظمة تعبير أخرى، كالتعبير في نظام مخصص للبروتينات السامة، أو التعبير في حقيقيات النوى (الخميرة) أو التعبير ضمن نظام يكون فيه البروتين المعبر عنه مرتبطاً مع سلسلة متعدد ببتيد إضافية وبالتالي فإن البروتين الناتج يكون بشكله غير الفعال.
2. دراسة العائلة التي ينتمي إليها هذا البروتياز إضافةً إلى محاولة الكشف عن الركائز النوعية التي يستهدفها والتي تساهم في عملية الموت الخلوي، مما يساعدنا في فهم آلية حدوث هذه العملية.
3. استخدام البروتين كمستضد نوعي لمعرفة دوره في تحريض الإستجابة المناعية، وبالتالي إمكانية تطوير لقاحات فعالة تساعد في القضاء على داء البروسيلات.

الفصل الرابع

المراجع العلمية

1. Adams, L.G. (1990). Advances in Brucellosis Research. Texas A&M University Press, College Station.

2. Aizenman, E., Engelberg-Kulka, H., and Glaser, G. (1996). An Escherichia coli chromosomal "addiction module" regulated by guanosine [corrected] 3',5'-bispyrophosphate: a model for programmed bacterial cell death. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93, 6059-6063.

3. Al-Balaa, B., Wouters, J., Dogne, S., Rossini, C., Schaus, J.M., Depiereux, E., Vandenhaute, J., and Housen, I. (2006). Identification, cloning, and expression of the Scytalidium acidophilum XYL1 gene encoding for an acidophilic xylanase. Bioscience, biotechnology, and biochemistry 70, 269-272.

4. Al-Mariri, A., Tibor, A., Mertens, P., De Bolle, X., Michel, P., Godefroid, J., Walravens, K., and Letesson, J.J. (2001a). Protection of BALB/c mice against Brucella abortus 544 challenge by vaccination with bacterioferritin or P39 recombinant proteins with CpG oligodeoxynucleotides as adjuvant. Infection and immunity 69, 4816-4822.

5. Al-Mariri, A., Tibor, A., Mertens, P., De Bolle, X., Michel, P., Godfroid, J., Walravens, K., and Letesson, J.J. (2001b). Induction of immune response in BALB/c mice with a DNA vaccine encoding bacterioferritin or P39 of Brucella spp. Infection and immunity 69, 6264-6270.

6. Al-Mariri, A. (2010). Protection of BALB/c mice against Brucella melitensis 16 M infection induced by vaccination with live Escherchia coli expression Brucella P39 protein. Vaccine 28, 1766-1770.

7. Almuneef, M., and Memish, Z.A. (2003). Prevalence of Brucella antibodies after acute brucellosis. Journal of chemotherapy (Florence, Italy) 15, 148-151.

8. Al-Tawfiq, J.A. (2006). Brucella epididymo-orchitis: a consideration in endemic area. Int Braz J Urol 32, 313-315.

9. Alton, G.G. (1987). Control of Brucella melitensis infection in sheep and goats--a review. Tropical animal health and production 19, 65-74.

10. Ameisen, J.C. (1996). The origin of programmed cell death. Science (New York, N.Y 272, 1278-1279.

11. Anilkumar, G., Srinivasan, R., and Ajitkumar, P. (2004). Genomic organization and in vivo characterization of proteolytic activity of FtsH of Mycobacterium smegmatis SN2. Microbiology (Reading, England) 150, 2629-2639.

12. Arenas, G.N., Staskevich, A.S., Aballay, A., and Mayorga, L.S. (2000). Intracellular trafficking of Brucella abortus in J774 macrophages. Infection and immunity 68, 4255-4263.

13. Baldwin, C.L., and Goenka, R. (2006). Host immune responses to the intracellular bacteria Brucella: does the bacteria instruct the host to facilitate chronic infection Critical reviews in immunology 26, 407-442.

14. Barrett, A.J., and McDonald, J.K. (1986). Nomenclature: protease, proteinase and peptidase. The Biochemical journal 237, 935.

15. Birnbaum, S., and Bailey, J.E. (1991). Plasmid presence changes the relative levels of many host cell proteins and ribosome components in recombinant Escherichia coli. Biotechnology and bioengineering 37, 736-745.

16. Boschiroli, M.L., Foulongne, V., and O'Callaghan, D. (2001). Brucellosis: a worldwide zoonosis. Current opinion in microbiology 4, 58-64.

17. Bruce, D. (1887). Note on the discovery of a microorganism in Malta Fever.

18. Bruno, S., Del Bino, G., Lassota, P., Giaretti, W., and Darzynkiewicz, Z. (1992). Inhibitors of proteases prevent endonucleolysis accompanying apoptotic death of HL-60 leukemic cells and normal thymocytes. Leukemia 6, 1113-1120.

19. Bryce-Smith, D. (1989.). Zinc-deficiency: the neglected factor. Chem. Br. 25:783–786.

20. Butler, A. (1998). Acquisition and utilization of transition metal ions by marine organisms. Science (New York, N.Y 281, 207-210.

21. Capasso, L. (2002). Bacteria in two-millennia-old cheese, and related epizoonoses in Roman populations. The Journal of infection 45, 122-127.

22. Cardoso, P.G., Macedo, G.C., Azevedo, V., and Oliveira, S.C. (2006). Brucella spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. Microbial cell factories 5, 13.

23. Cheers, C., Pavlov, H., Riglar, C., and Madraso, E. (1980). Macrophage activation during experimental murine brucellosis. III. Do macrophages exert feedback control during brucellosis? Cellular immunology 49, 168-177.

24. Cheville, N.F., Stevens, M.G., Jensen, A.E., Tatum, F.M., and Halling, S.M. (1993). Immune responses and protection against infection and abortion in cattle experimentally vaccinated with mutant strains of Brucella abortus. American journal of veterinary research 54, 1591-1597.

25. Christianson, D.W., and Cox, J.D. (1999). Catalysis by metal-activated hydroxide in zinc and manganese metalloenzymes. Annual review of biochemistry 68, 33-57.

26. Christensen, S.K., Maenhaut-Michel, G., Mine, N., Gottesman, S., Gerdes, K., and Van Melderen, L. (2004). Overproduction of the Lon protease triggers inhibition of translation in Escherichia coli: involvement of the yefM-yoeB toxin-antitoxin system. Molecular microbiology 51, 1705-1717.

27. Chukwu, C.C. (1985). Serological investigation on cattle vaccinated with a killed Brucella abortus strain 45/20 adjuvant vaccine. International journal of zoonoses 12, 14-21.

28. Comerci, D.J., Martinez-Lorenzo, M.J., Sieira, R., Gorvel, J.P., and Ugalde, R.A. (2001). Essential role of the VirB machinery in the maturation of the Brucella abortus-containing vacuole. Cellular microbiology 3, 159-168.

29. Corbel, M.J. (1997a). Brucellosis: an overview. Emerging infectious diseases 3, 213-221.

30. Corbel, M.J. (1997b). Recent advances in brucellosis. Journal of medical microbiology 46, 101-103.

31. Corbel, M.J. (1997c). Vaccines against bacterial zoonoses. Journal of medical microbiology 46, 267-269.

32. Corbel, M.J.,and Banai, M. (2005). Genus I. Brucella Meyer and Shaw 1920, 173AL. In: Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. (Eds.), Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2 (part C). Springer, 370–386.

33. Cornillon, S., Foa, C., Davoust, J., Buonavista, N., Gross, J.D., and Golstein, P. (1994). Programmed cell death in Dictyostelium. Journal of cell science 107 (Pt 10), 2691-2704.

34. Delrue, R.M., Lestrate, P., Tibor, A., Letesson, J.J., and De Bolle, X. (2004). Brucella pathogenesis, genes identified from random large-scale screens. FEMS microbiology letters 231, 1-12.

35. DelVecchio, V.G., Kapatral, V., Elzer, P., Patra, G., and Mujer, C.V. (2002a). The genome of Brucella melitensis. Veterinary microbiology 90, 587-592.

36. DelVecchio, V.G., Kapatral, V., Redkar, R.J., Patra, G., Mujer, C., Los, T., Ivanova, N., Anderson, I., Bhattacharyya, A., Lykidis, A., Reznik, G., Jablonski, L., Larsen, N., D'Souza, M., Bernal, A., Mazur, M., Goltsman, E., Selkov, E., Elzer, P.H., Hagius, S., O'Callaghan, D., Letesson, J.J., Haselkorn, R., Kyrpides, N., and Overbeek, R. (2002b). The genome sequence of the facultative intracellular pathogen Brucella melitensis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99, 443-448.

37. Detilleux, P.G., Deyoe, B.L., and Cheville, N.F. (1991). Effect of endocytic and metabolic inhibitors on the internalization and intracellular growth of Brucella abortus in Vero cells. American journal of veterinary research 52, 1658-1664.

38. Dong, H., Nilsson, L., and Kurland, C.G. (1995). Gratuitous overexpression of genes in Escherichia coli leads to growth inhibition and ribosome destruction. Journal of bacteriology 177, 1497-1504.

39. Donnelly, J.J., Wahren, B., and Liu, M.A. (2005). DNA vaccines: progress and challenges. J Immunol 175, 633-639.

40. Elberg, S.S., and Faunce, K., Jr. (1957). Immunization against Brucella infection. VI. Immunity conferred on goats by a nondependent mutant from a streptomycin-dependent mutant strain of Brucella melitensis. Journal of bacteriology 73, 211-217.

41. Elzer, P.H., Hagius, S.D., Davis, D.S., DelVecchio, V.G., and Enright, F.M. (2002). Characterization of the caprine model for ruminant brucellosis. Veterinary microbiology 90, 425-431.

42. Engelberg-Kulka, H., Hazan, R., and Amitai, S. (2005). mazEF: a chromosomal toxin-antitoxin module that triggers programmed cell death in bacteria. Journal of cell science 118, 4327-4332.

43. Engelberg-Kulka, H., Reches, M., Narasimhan, S., Schoulaker-Schwarz, R., Klemes, Y., Aizenman, E., and Glaser, G. (1998). rexB of bacteriophage lambda is an anti-cell death gene. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95, 15481-15486.

44. Erez, E., Fass, D., and Bibi, E. (2009). How intramembrane proteases bury hydrolytic reactions in the membrane. Nature 459, 371-378.

45. Evans, A. (1950). Comments on the early history of human brucellosis, Cleghorn G. Observations of the epidemical diseases of Minorca (from Years 1744 to 1749). Brucellosis.

46. Felix, F., and Brouillet, N. (1990). Purification and properties of uroporphyrinogen decarboxylase from Saccharomyces cerevisiae. Yeast uroporphyrinogen decarboxylase. European journal of biochemistry / FEBS 188, 393-403.

47. Fozo, E.M., Hemm, M.R., and Storz, G. (2008). Small toxic proteins and the antisense RNAs that repress them. Microbiol Mol Biol Rev 72, 579-589, Table of Contents.

48. Garin-Bastuji, B., Blasco, J.M. (2008). Chapter 2.7.2. Caprine and ovine brucellosis (excluding Brucella ovis).In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 6th ed. OIE, Paris, France, 974–982.

49. Gee, J.M., Valderas, M.W., Kovach, M.E., Grippe, V.K., Robertson, G.T., Ng, W.L., Richardson, J.M., Winkler, M.E., and Roop, R.M., 2nd. (2005). The Brucella abortus Cu,Zn superoxide dismutase is required for optimal resistance to oxidative killing by murine macrophages and wild-type virulence in experimentally infected mice. Infection and immunity 73, 2873-2880.

50. Godfroid, F., Taminiau, B., Danese, I., Denoel, P., Tibor, A., Weynants, V., Cloeckaert, A., Godfroid, J., and Letesson, J.J. (1998). Identification of the perosamine synthetase gene of Brucella melitensis 16M and involvement of lipopolysaccharide O side chain in Brucella survival in mice and in macrophages. Infection and immunity 66, 5485-5493.

51. Godfroid, J., Cloeckaert, A., Liautard, J.P., Kohler, S., Fretin, D., Walravens, K., Garin-Bastuji, B., and Letesson, J.J. (2005). From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. Veterinary research 36, 313-326.

52. Gorvel, J.P. (2008). Brucella: a Mr "Hide" converted into Dr Jekyll. Microbes and infection / Institut Pasteur 10, 1010-1013.

53. Gorvel, J.P., and Moreno, E. (2002). Brucella intracellular life: from invasion to intracellular replication. Veterinary microbiology 90, 281-297.

54. Gupta, R., Beg, Q.K., and Lorenz, P. (2002). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. Applied microbiology and biotechnology 59, 15-32.

55. Gupta, R.S. (2005). Protein signatures distinctive of alpha proteobacteria and its subgroups and a model for alpha-proteobacterial evolution. Critical reviews in microbiology 31, 101-135.

56. Halling, S.M., Detilleux, P.G., Tatum, F.M., Judge, B.A., and Mayfield, J.E. (1991). Deletion of the BCSP31 gene of Brucella abortus by replacement. Infection and immunity 59, 3863-3868.

57. Halling, S.M., Peterson-Burch, B.D., Bricker, B.J., Zuerner, R.L., Qing, Z., Li, L.L., Kapur, V., Alt, D.P., and Olsen, S.C. (2005). Completion of the genome sequence of Brucella abortus and comparison to the highly similar genomes of Brucella melitensis and Brucella suis. Journal of bacteriology 187, 2715-2726.

58. Hammond, S.E., and Hanna, P.C. (1998). Lethal factor active-site mutations affect catalytic activity in vitro. Infection and immunity 66, 2374-2378.

59. Hase, C.C., and Finkelstein, R.A. (1993). Bacterial extracellular zinc-containing metalloproteases. Microbiological reviews 57, 823-837.

60. Hayes, F. (2003). Toxins-antitoxins: plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest. Science (New York, N.Y 301, 1496-1499.

61. Hazan, R., Sat, B., and Engelberg-Kulka, H. (2004). Escherichia coli mazEF-mediated cell death is triggered by various stressful conditions. Journal of bacteriology 186, 3663-3669.

62. He, Y. (2000). INDUCTION OF PROTECTION, ANTIBODIES AND CELL MEDIATED IMMUNE RESPONSES BY BRUCELLA ABORTUS STRAIN RB51, OCHROBACTRUM ANTHROPI AND RECOMBINANTS THEREOF. Blacksburg, Virginia.

63. Hochman, A. (1997). Programmed cell death in prokaryotes. Critical reviews in microbiology 23, 207-214.

64. Hooper, N.M. (1994). Families of zinc metalloproteases. FEBS letters 354, 1-6.

65. Hu, X.D., Yu, D.H., Chen, S.T., Li, S.X., and Cai, H. (2009). A combined DNA vaccine provides protective immunity against Mycobacterium bovis and Brucella abortus in cattle. DNA and cell biology 28, 191-199.

66. Ito, K., Nakajima, Y., Onohara, Y., Takeo, M., Nakashima, K., Matsubara, F., Ito, T., and Yoshimoto, T. (2006). Crystal structure of aminopeptidase N (proteobacteria alanyl aminopeptidase) from Escherichia coli and conformational change of methionine 260 involved in substrate recognition. The Journal of biological chemistry 281, 33664-33676.

67. Karbalaei-Heidari, H.R., Amoozegar, M.A., Hajighasemi, M., Ziaee, A.A., and Ventosa, A. (2009). Production, optimization and purification of a novel extracellular protease from the moderately halophilic bacterium Halobacillus karajensis. Journal of industrial microbiology & biotechnology 36, 21-27.

68. Keilin, D., and Mann, T. (1940). Carbonic anhydrase. Purification and nature of the enzyme. The Biochemical journal 34, 1163-1176.

69. Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. British journal of cancer 26, 239-257.

70. Kim, S.K., Yang, J.Y., and Cha, J. (2002). Cloning and sequence analysis of a novel metalloprotease gene from Vibrio parahaemolyticus 04. Gene 283, 277-286.

71. Klinman, D.M., Takeno, M., Ichino, M., Gu, M., Yamshchikov, G., Mor, G., and Conover, J. (1997). DNA vaccines: safety and efficacy issues. Springer seminars in immunopathology 19, 245-256.

72. Kohler, S., Foulongne, V., Ouahrani-Bettache, S., Bourg, G., Teyssier, J., Ramuz, M., and Liautard, J.P. (2002). The analysis of the intramacrophagic virulome of Brucella suis deciphers the environment encountered by the pathogen inside the macrophage host cell. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99, 15711-15716.

73. Kumar, C.G., and Takagi, H. (1999). Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. Biotechnology advances 17, 561-594.

74. Lalli, G., Bohnert, S., Deinhardt, K., Verastegui, C., and Schiavo, G. (2003). The journey of tetanus and botulinum neurotoxins in neurons. Trends in microbiology 11, 431-437.

75. Leclerq, S., Harms, J.S., Rosinha, G.M., Azevedo, V., and Oliveira, S.C. (2002). Induction of a th1-type of immune response but not protective immunity by intramuscular DNA immunisation with Brucella abortus GroEL heat-shock gene. Journal of medical microbiology 51, 20-26.

76. Lee, S.W., Ko, Y.G., Bang, S., Kim, K.S., and Kim, S. (2000). Death effector domain of a mammalian apoptosis mediator, FADD, induces bacterial cell death. Molecular microbiology 35, 1540-1549.

77. Levine, B., and Yuan, J. (2005). Autophagy in cell death: an innocent convict? The Journal of clinical investigation 115, 2679-2688.

78. Lockshin, R.A., and Williams, C.M. (1964). Programmed cell death.Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkmoths. J Insect Physiol, 643-649.

79. Lucero, N.E., Ayala, S.M., Escobar, G.I., Grayon, M., and Jacques, I. (2006). A new variant of Brucella melitensis. Clin Microbiol Infect 12, 593-596.

80. Marianovsky, I., Aizenman, E., Engelberg-Kulka, H., and Glaser, G. (2001). The regulation of the Escherichia coli mazEF promoter involves an unusual alternating palindrome. The Journal of biological chemistry 276, 5975-5984.

81. McCall, K.A., Huang, C., and Fierke, C.A. (2000). Function and mechanism of zinc metalloenzymes. The Journal of nutrition 130, 1437S-1446S.

82. Meyer, K.F., Shaw, E.B.,. (1920). A comparison of the morphological, cultural and biochemical characteristics of B. abortus and B. melitensis.

83. Mittl, P.R., and Grutter, M.G. (2006). Opportunities for structure-based design of protease-directed drugs. Current opinion in structural biology 16, 769-775.

84. Miyoshi, S., Oh, E.G., Hirata, K., and Shinoda, S. (1993). Exocellular toxic factors produced by Vibrio vulnificus. J. Toxicol. Toxin Rev. 12, 253–288.

85. Miyoshi, S., and Shinoda, S. (2000). Microbial metalloproteases and pathogenesis. Microbes and infection / Institut Pasteur 2, 91-98.

86. Moncrief, J.S., Obiso, R., Jr., Barroso, L.A., Kling, J.J., Wright, R.L., Van Tassell, R.L., Lyerly, D.M., and Wilkins, T.D. (1995). The enterotoxin of Bacteroides fragilis is a metalloprotease. Infection and immunity 63, 175-181.

87. Moreno, E., Cloeckaert, A., and Moriyon, I. (2002). Brucella evolution and taxonomy. Veterinary microbiology 90, 209-227.

88. Moreno, E., and Moriyon, I. (2002). Brucella melitensis: a nasty bug with hidden credentials for virulence. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99, 1-3.

89. Morgan, W.J., Littlejohn, A.I., Mackinnon, D.J., and Lawson, J.R. (1966). The degree of protection given by living vaccines against experimental infection with Brucella melitensis in goats. Bulletin of the World Health Organization 34, 33-40.

90. Moriyon, I., Grillo, M.J., Monreal, D., Gonzalez, D., Marin, C., Lopez-Goni, I., Mainar-Jaime, R.C., Moreno, E., and Blasco, J.M. (2004). Rough vaccines in animal brucellosis: structural and genetic basis and present status. Veterinary research 35, 1-38.

91. Naito, T., Kusano, K., and Kobayashi, I. (1995). Selfish behavior of restriction-modification systems. Science (New York, N.Y 267, 897-899.

92. Nicoletti, P. (2002). A short history of brucellosis. Veterinary microbiology 90, 5-9.

93. Nicoletti, P., Ring, J., Boysen, B., and Buczek, J. (1986). Illness in a veterinary student following accidental inoculation of Brucella abortus strain 19. J Am Coll Health 34, 236-237.

94. Nielsen, K., and Ewalt, D.R. (2008). Chapter 2.4.3. Bovine Brucellosis.In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 6th edition. OIE, Paris,France, 624–660.

95. Norqvist, A., Norrman, B., and Wolf-Watz, H. (1990). Identification and characterization of a zinc metalloprotease associated with invasion by the fish pathogen Vibrio anguillarum. Infection and immunity 58, 3731-3736.

96. Novy, R., and Morris, B. (2001). Use of glucose to control basal expression in the pET System. Novagen, Inc, 8-10.

97. Oliveira, S.C., and Splitter, G.A. (1996). Immunization of mice with recombinant L7/L12 ribosomal protein confers protection against Brucella abortus infection. Vaccine 14, 959-962.

98. Pappas, G., Akritidis, N., Bosilkovski, M., and Tsianos, E. (2005). Brucellosis. The New England journal of medicine 352, 2325-2336.

99. Pelmenschikov, V., Blomberg, M.R., and Siegbahn, P.E. (2002). A theoretical study of the mechanism for peptide hydrolysis by thermolysin. J Biol Inorg Chem 7, 284-298.

100. Pelmenschikov, V., and Siegbahn, P.E. (2002). Catalytic mechanism of matrix metalloproteinases: two-layered ONIOM study. Inorganic chemistry 41, 5659-5666.

101. Polaina, J., and MacCabe, A. (2007). Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications.

102. Polgar, L. (1989). Transition state stabilization and enzymic rate acceleration. Acta biochimica et biophysica Hungarica 24, 25-32.

103. Puente, X.S., Sanchez, L.M., Overall, C.M., and Lopez-Otin, C. (2003). Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. Nature reviews 4, 544-558.

104. Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., and Deshpande, V.V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiol Mol Biol Rev 62, 597-635.

105. Rawlings, N.D., Tolle, D.P., and Barrett, A.J. (2004). MEROPS: the peptidase database. Nucleic acids research 32, D160-164.

106. Refai, M. (2002). Incidence and control of brucellosis in the Near East region. Veterinary microbiology 90, 81-110.

107. Robertson, G.T., Kovach, M.E., Allen, C.A., Ficht, T.A., and Roop, R.M., 2nd. (2000). The Brucella abortus Lon functions as a generalized stress response protease and is required for wild-type virulence in BALB/c mice. Molecular microbiology 35, 577-588.

108. Robertson, G.T., and Roop, R.M., Jr. (1999). The Brucella abortus host factor I (HF-I) protein contributes to stress resistance during stationary phase and is a major determinant of virulence in mice. Molecular microbiology 34, 690-700.

109. Roop, R.M., 2nd, Bellaire, B.H., Valderas, M.W., and Cardelli, J.A. (2004). Adaptation of the Brucellae to their intracellular niche. Molecular microbiology 52, 621-630.

110. Roop, R.M., 2nd, Phillips, R.W., Hagius, S., Walker, J.V., Booth, N.J., Fulton, W.T., Edmonds, M.D., and Elzer, P.H. (2001). Re-examination of the role of the Brucella melitensis HtrA stress response protease in virulence in pregnant goats. Veterinary microbiology 82, 91-95.

111. Rosinha, G.M., Myioshi, A., Azevedo, V., Splitter, G.A., and Oliveira, S.C. (2002). Molecular and immunological characterisation of recombinant Brucella abortus glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase, a T- and B-cell reactive protein that induces partial protection when co-administered with an interleukin-12-expressing plasmid in a DNA vaccine formulation. Journal of medical microbiology 51, 661-671.

112. Samaha, H., Al-Rowaily, M., Khoudair, R.M., and Ashour, H.M. (2008). Multicenter study of brucellosis in Egypt. Emerging infectious diseases 14, 1916-1918.

113. Sangari, F.J., Aguero, J., and Garcia-Lobo, J.M. (2000). The genes for erythritol catabolism are organized as an inducible operon in Brucella abortus. Microbiology (Reading, England) 146 (Pt 2), 487-495.

114. Sangari, F.J., Seoane, A., Rodriguez, M.C., Aguero, J., and Garcia Lobo, J.M. (2007). Characterization of the urease operon of Brucella abortus and assessment of its role in virulence of the bacterium. Infection and immunity 75, 774-780.

115. Sat, B., Hazan, R., Fisher, T., Khaner, H., Glaser, G., and Engelberg-Kulka, H. (2001). Programmed cell death in Escherichia coli: some antibiotics can trigger mazEF lethality. Journal of bacteriology 183, 2041-2045.

116. Sat, B., Reches, M., and Engelberg-Kulka, H. (2003). The Escherichia coli mazEF suicide module mediates thymineless death. Journal of bacteriology 185, 1803-1807.

117. Schmidt, F.R. (2004). Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. Applied microbiology and biotechnology 65, 363-372.

118. Seife, C. (1997). Blunting nature's Swiss army knife. Science (New York, N.Y 277, 1602-1603.

119. Shoop, W.L., Xiong, Y., Wiltsie, J., Woods, A., Guo, J., Pivnichny, J.V., Felcetto, T., Michael, B.F., Bansal, A., Cummings, R.T., Cunningham, B.R., Friedlander, A.M., Douglas, C.M., Patel, S.B., Wisniewski, D., Scapin, G., Salowe, S.P., Zaller, D.M., Chapman, K.T., Scolnick, E.M., Schmatz, D.M., Bartizal, K., MacCoss, M., and Hermes, J.D. (2005). Anthrax lethal factor inhibition. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102, 7958-7963.

120. Sieira, R., Comerci, D.J., Sanchez, D.O., and Ugalde, R.A. (2000). A homologue of an operon required for DNA transfer in Agrobacterium is required in Brucella abortus for virulence and intracellular multiplication. Journal of bacteriology 182, 4849-4855.

121. Sly, W.S., Hewett-Emmett, D., Whyte, M.P., Yu, Y.S., and Tashian, R.E. (1983). Carbonic anhydrase II deficiency identified as the primary defect in the autosomal recessive syndrome of osteopetrosis with renal tubular acidosis and cerebral

calcification. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 80, 2752-2756.

122. Smith, L.D., and Ficht, T.A. (1990). Pathogenesis of Brucella. Critical reviews in microbiology 17, 209-230.

123. Spink, W.W. (1956). The Nature of Brucellosis. Minnesota Press, Minneapolis.

124. Squier, M.K., Miller, A.C., Malkinson, A.M., and Cohen, J.J. (1994). Calpain activation in apoptosis. Journal of cellular physiology 159, 229-237.

125. Stocker, W., and Bode, W. (1995). Structural features of a superfamily of zinc-endopeptidases: the metzincins. Current opinion in structural biology 5, 383-390.

126. Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., and Dubendorff, J.W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. Methods in enzymology 185, 60-89.

127. Szabo, C. (2005). Mechanisms of cell necrosis. Critical care medicine 33, S530-534.

128. Tabatabai, L.B., and Pugh, G.W., Jr. (1994). Modulation of immune responses in Balb/c mice vaccinated with Brucella abortus Cu-Zn superoxide dismutase synthetic peptide vaccine. Vaccine 12, 919-924

129. Tallant, C., Marrero, A., and Gomis-Ruth, F.X. (2010). Matrix metalloproteinases: fold and function of their catalytic domains. Biochimica et biophysica acta 1803, 20-28.

130. Teo, J.W., Zhang, L.H., and Poh, C.L. (2003). Cloning and characterization of a metalloprotease from Vibrio harveyi strain AP6. Gene 303, 147-156.

131. Topcu, Z. (2000). An optimized recipe for cloning of the polymerase chain reaction-amplified DNA inserts into plasmid vectors. Acta biochimica Polonica 47, 841-846.

132. Tubulekas, I., and Hughes, D. (1993). Growth and translation elongation rate are sensitive to the concentration of EF-Tu. Molecular microbiology 8, 761-770.

133. Ugalde, J.E., Czibener, C., Feldman, M.F., and Ugalde, R.A. (2000). Identification and characterization of the Brucella abortus phosphoglucomutase gene: role of lipopolysaccharide in virulence and intracellular multiplication. Infection and immunity 68, 5716-5723.

134. Ugalde, R.A. (1999). Intracellular lifestyle of Brucella spp. Common genes with other animal pathogens, plant pathogens, and endosymbionts. Microbes and infection / Institut Pasteur 1, 1211-1219.

135. Vallee, B.L. (1986). A synopsis of zinc biology and pathology in zinc enzymes.

136. Vallee, B.L., and Auld, D.S. (1990). Active-site zinc ligands and activated H2O of zinc enzymes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 87, 220-224.

137. Vallee, B.L., and Auld, D.S. (1992a). Active zinc binding sites of zinc metalloenzymes. Matrix (Stuttgart, Germany) 1, 5-19.

138. Vallee, B.L., and Auld, D.S. (1992b). Functional zinc-binding motifs in enzymes and DNA-binding proteins. Faraday discussions, 47-65.

139. Vallee, B.L., and Auld, D.S. (1993a). Cocatalytic zinc motifs in enzyme catalysis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90, 2715-2718.

140. Vallee, B.L., and Auld, D.S. (1993b). New perspective on zinc biochemistry: cocatalytic sites in multi-zinc enzymes. Biochemistry 32, 6493-6500.

141. Vallee, B.L., and Neurath, H. (1955). Carboxypeptidase, a zinc metalloenzyme. The Journal of biological chemistry 217, 253-261.

142. Vanyushin, B.F., Bakeeva, L.E., Zamyatnina, V.A., and Aleksandrushkina, N.I. (2004). Apoptosis in plants: specific features of plant apoptotic cells and effect of various factors and agents. International review of cytology 233, 135-179.

143. Vassallo, D.J. (1992). The corps disease: brucellosis and its historical association with the Royal Army Medical Corps. Journal of the Royal Army Medical Corps 138, 140-150.

144. Vellard, M. (2003). The enzyme as drug: application of enzymes as pharmaceuticals. Current opinion in biotechnology 14, 444-450.

145. Verger, J.M., Grimont, F., Grimont, P.A., and Grayon, M. (1987). Taxonomy of the genus Brucella. Annales de l'Institut Pasteur 138, 235-238.

146. Vind, J., Sorensen, M.A., Rasmussen, M.D., and Pedersen, S. (1993). Synthesis of proteins in Escherichia coli is limited by the concentration of free ribosomes. Expression from reporter genes does not always reflect functional mRNA levels. Journal of molecular biology 231, 678-688.

147. Vizcaino, N., Cloeckaert, A., Zygmunt, M.S., and Dubray, G. (1996). Cloning, nucleotide sequence, and expression of the Brucella melitensis omp31 gene coding for an immunogenic major outer membrane protein. Infection and immunity 64, 3744-3751

148. Welburn, S.C., Lillico, S., and Murphy, N.B. (1999). Programmed cell death in procyclic form Trypanosoma brucei rhodesiense --identification of differentially expressed genes during con A induced death. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 94, 229-234.

149. WHO. (2009). Integrated control of neglected zoonotic diseases in Africa. Releve epidemiologique hebdomadaire / Section d'hygiene du Secretariat de la Societe des Nations = Weekly epidemiological record / Health Section of the Secretariat of the League of Nations 84, 147-148.

150. Williams, A.E., Keppie, J., and Smith, H. (1964). The Relation of Erythritol Usage to Virulence in the Brucellas. Journal of general microbiology 37, 285-292.

151. Williams, K.P., Sobral, B.W., and Dickerman, A.W. (2007). A robust species tree for the alphaproteobacteria. Journal of bacteriology 189, 4578-4586.

152. Williams, R.J.P. (1987.). The biochemistry of zinc. Polyhedron 6: 61–69.

153. Wretlind, B., and Pavlovskis, O.R. (1983). Pseudomonas aeruginosa elastase and its role in pseudomonas infections. Reviews of infectious diseases 5 Suppl 5, S998-1004.

154. Wu, H.J., Wang, A.H., and Jennings, M.P. (2008). Discovery of virulence factors of pathogenic bacteria. Current opinion in chemical biology 12, 93-101.

155. Wyatt, H.V. (1996). Brucella melitensis can be transmitted sexually. Lancet 348, 615.

156. Wyllie, A.H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. Nature 284, 555-556.

157. Young, E., and Bennett's, J.M.D.a. (2000). principles and practice of infectious diseases. 4th Edition. Churchill Livingstone Co, 2386–2391.

158. Young, E.J. (2005). Brucella species. In: Mandell, G. L., J. E. Bennett, R. Dolin (eds). Mandell, Douglas and Bennett’s Principles and Practice of Infectious Diseases. Elsevier, Churchill, Livingstone, Philadelphia, USA, 2669–2674.

159. Yu, D.H., Hu, X.D., and Cai, H. (2007). A combined DNA vaccine encoding BCSP31, SOD, and L7/L12 confers high protection against Brucella abortus 2308 by inducing specific CTL responses. DNA and cell biology 26, 435-443.

160. Zaiter, D., Ali, D., Al-Balaa, B., Al-Mariri, A., Hamad, E. (2010). Cloning and expression of Brucella melitensis zinc protease gene. Agriculture science magazine 1 (3), 169-176.

ABSTRACT

The gene encoding a novel zinc protease from *B. melitensis* has been isolated and amplified by PCR using extracted *B.melitensis* genomic DNA as a template. A primer pair was designed from this gene containing restriction sites of NdeI and BamHI at 5'and 3' end, respectively. Those Primers were used to amplify an insert of 927 bp. This amplicon was digested and inserted into the NdeI-BamHI cut expression vector pET-15b. Cloned gene sequence analysis revealed that, no mutations were introduced during the cloning process and the whole open read frame (ORF) of 927 bp zinc protease gene is inserted in frame into the expression system (pET-15b vector) in order to ensure the production of the recombinant protein of insert. After that the recombinant plasmid was transformed into *Escherichia coli* BL21 for protein expression. Zinc protease gene was then expressed using IPTG as an inducer. The expression of this enzyme was optimized by changing expression conditions such as IPTG concentration and temperature. But in all of these conditions, expression of zinc protease in *E. coli* was toxic and resulted in growth arrest and filamentation of cells.Whereas, induction the expression of this protease induced bacterial cell death, two hours after expression induction. Proteolytic activity for zinc protease was detected by the hydrolysis of skim milk in LB media agar forming a clear halo around the colonies.

Syrian Arab Republic
Damascus University-Science Faculty
Plant Biology Department

Atomic Energy Commission of Syria
Department of Molecular Biology and Biotechnology
Microbiology and immunology Division

Identification and expression of *Brucella melitensis* zinc protease gene

Thesis submitted for Master's degree in Microbiology

By

DANA ZAITER

Supervisors

Major Supervisor
Prof. Dr. Ibtissam Hamad

Co-Supervisor
Dr. Ayman Al Mariri

Scientific Cooperation
Dr. Bassam Al Balaa

Judgment Staff:

Prof. Dr. Ibtissam Hamad	**Faculty of science-Damascus University**
Prof. Dr. Essam Kassem	**Faculty of science-Damascus University**
Dr. Bassam Al Balaa	**Syrian Atomic Energy Commission**

MON 18.10.2010